GLUTATHION UND INSULINSEKRETION

Mikromethoden zur Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Langerhansschen Inseln

Beziehungen zwischen dem $\frac{GSH}{GSSG}$ – Quotienten und glucoseinduzierter Insulinsekretion

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Andreas Grimm
aus Baden-Baden

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0016

GLUTATHION UND INSULINSEKRETION

Mikromethoden zur Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Langerhansschen Inseln

Beziehungen zwischen dem $\frac{GSH}{GSSG}$ – Quotienten und glucoseinduzierter Insulinsekretion

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Andreas Grimm
aus Baden-Baden

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Juni 1978

Dekan: Professor Dr. H. Auterhoff

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.P.T. Ammon

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff

Meinen Eltern

in Dankbarkeit

gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im Oktober 1974 unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im April 1978 abgeschlossen.

Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, die zahlreichen Anregungen und die freundliche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ferner danke ich allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Herrn Prof. Ammon für stete Diskussionsbereitschaft und gute Zusammenarbeit.

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
6-AN	6-Aminonicotinsäureamid
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
t-BHP	tert. Butylhydroperoxid
p-CMB	para-Chlormercuribenzoat
DTNB	5,5'-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure) Ellmans Reagens
E	Einheiten
ΔE	Extinktionsänderung
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
G-6-P	Glucose-6-phosphat
G-6-P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IRI	immunoreaktives Insulin
KRB-Lösung	Krebs-Ringer-Bicarbonat-Lösung
MB	Methylenblau
MPA	Metaphosphorsäure
µE	Mikroeinheiten
µM	mikromolar
µmol	Mikromol
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat

NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NEM	N-Äthylmaleinimid
n.s.	nicht signifikant
OPT	Orthophthaldialdehyd
P	Probability
pM	picomolar
pmol	Picomol
POD	Glutathionperoxidase
PPS	Pentosephosphatshunt
SEM	standard error of the mean
Trap	Triäthanolaminpuffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.2	Fragestellung	6
2.	MATERIAL	8
2.1	Versuchstiere	8
2.2	Chemikalien, Enzyme	8
2.3	Nährlösungen	9
2.3.1	Hanks' Lösung	9
2.3.2	KRB-Lösung	10
2.3.2.1	Inkubationslösungen	11
2.4	Geräte	12
3.	METHODIK	14
3.1	Glutathion-Bestimmung: Aufstellung einer Mikromethode zur Bestimmung von GSH und GSSG	14
3.1.1	Enzymatic cycling	14
3.1.1.1	Beschreibung der Methode	14
3.1.1.2	Durchführung nach Tietze	17
3.1.1.3	Modifikation der enzymatic cycling-Methode	21
3.1.1.3.1	Verlängerung der Cyclingzeit	21
3.1.1.3.2	Variation der Enzymkonzentration	23
3.1.1.3.3	Variation der Konzentration an Ellmans Reagens	27
3.1.1.3.4	Wahl eines geeigneten Puffers	29
3.1.1.3.5	Erhöhung der Reaktionstemperatur	32
3.1.1.3.6	Untersuchungen zur Auffindung der geeigneten Säure für die Enteiweißung	35
3.1.1.3.7	Umstellung des Tests auf Serienbestimmung	40

		Seite
3.1.1.3.8	Arbeitsvorschrift für die Mikro-Bestimmung von Gesamtglutathion in Geweben	42
3.1.1.4	Anwendung der modifizierten Mikromethode auf Rattenblut und Rattenleber	45
3.1.1.5	Anwendung der modifizierten Mikromethode auf Pankreasinseln	47
3.1.1.6	Bestimmung von GSSG durch enzymatic cycling nach Umsetzung von GSH mit NEM	53
3.1.1.7	Arbeitsvorschrift zur Bestimmung von GSH neben GSSG in Pankreasinseln	66
3.1.2	Fluorimetrische Bestimmung von Glutathion mit OPT	67
3.1.2.1	Beschreibung der Methode	68
3.1.2.2	Durchführung der GSH- und GSSG-Bestimmung nach Hissin und Hilf	69
3.1.2.3	Untersuchungen zur Spezifität der modifizierten OPT-Methode gegenüber GSH bzw. GSSG	75
3.1.2.4	Anwendung der OPT-Methode auf Rattenleber	88
3.1.2.5	Anwendung der OPT-Methode auf Pankreasinseln	90
3.1.2.6	GSSG-Wiederfindungsrate	94
3.1.2.7	GSH-Wiederfindungsrate	95
3.2	Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovsky	97
3.2.1	Operation	97
3.2.2	Isolierung der Langerhansschen Inseln	98
3.2.3	Vorinkubation	99
3.2.4	Hauptinkubation	100
3.2.5	Aufbereitung der Inseln zur Metabolitenbestimmung	100
3.2.6	Versuchsauswertung	101
4.	VERSUCHSERGEBNISSE	104
4.1	Einfluß von Glucose auf GSH, GSSG lösliches Gesamtglutathion sowie den GSH/GSSG-Quotienten, gemessen unter Verwendung der Cycling-Methode	104

		Seite
4.1.1	Gesamtglutathion	104
4.1.2	Reduziertes Glutathion	104
4.1.3	Oxidiertes Glutathion (GSSG)	109
4.1.4	GSH/GSSG-Quotient (Redox-Status)	109
4.2	Einfluß von Glucose auf GSH, GSSG und den GSH/GSSG-Quotienten, gemessen unter Verwendung der OPT-Methode	114
4.3	Einfluß von Methylenblau auf den GSH-, GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln, gemessen unter Verwendung der OPT-Methode	118
4.4	Einfluß von t-BHP auf den GSH-, GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln, gemessen unter Verwendung der OPT-Methode	118
4.5	Einfluß von Diamid auf den GSH-, GSSG-Gehalt und den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln, gemessen unter Verwendung der OPT-Methode	125
4.6	Beziehungen zwischen den NADPH/NADP- und GSH/GSSG-Quotienten unter Glucoseeinfluß	132
4.7	Beziehung zwischen der durch Diamid hervorgerufenen Senkung des GSH/GSSG-Quotienten und der durch diese Substanz hervorgerufenen Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion	132
5.	DISKUSSION	135
5.1	Stellung von Glutathion im Zellstoffwechsel	135
5.2	Konzentration von GSH und anderen SH-Verbindungen in Geweben	143
5.3	Einfluß von Glucose auf den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten der ß-Zelle	151
6.	ZUSAMMENFASSUNG	160
7.	LITERATURVERZEICHNIS	164

1. EINLEITUNG

1.1 Stand der Forschung

Die Bedeutung der Glucose als physiologisch stärkstem Stimulator der Insulinsekretion ist seit langem bekannt (1); über den genauen Mechanismus, durch den Glucose die Insulinsekretion auslöst, herrscht trotz intensiver Bearbeitung noch Unklarheit.

Von verschiedenen Autoren wird die Rolle der Glucose in die des Initiators (2) der Insulinsekretion und die des Energielieferanten (3) eingeteilt.

Die Ergebnisse, die nach Experimenten mit den verschiedensten Zuckern und Zuckeranalogen in vivo als auch in vitro vorliegen, scheinen verwirrend und teilweise widersprüchlich zu sein und sind schwer zu interpretieren (4-7).

Aus der Vielfalt der gemachten Beobachtungen ergaben sich folgende grundlegende Fragen:

Ist die glucoseinduzierte Insulinsekretion an den Metabolismus der Glucose in der β-Zelle geknüpft, übt das Glucosemolekül über einen Rezeptor an der Plasmamembran seinen Sekretionsreiz aus oder sind beide Faktoren notwendig?

Über einen hypothetischen Rezeptor könnte das Glucosemolekül unabhängig von seinem Metabolismus seine sekretorische Wirkung ausüben. Von Ashcroft et al. (8) wurden differenzierte Rezeptorsysteme postuliert: eine "initiation unit" kann nach Aktivierung durch ein geeignetes Agens die

Insulinsekretion in Gang bringen. Eine "potentiating unit" wird durch andere Agentien aktiviert und verstärkt dadurch den Effekt der "initiating unit".
Folgende Befunde sprechen für die Existenz eines Glucoserezeptors:

1. Die Fähigkeit von Monosacchariden (Glucose, Galactose), mehrwertigen Alkoholen (Xylitol und Sorbitol) und Zuckerderivaten (Glucosamin, 3-O-Methylglucose, 2-Desoxyglucose) die Insulinsekretion auszulösen, könnte durch das Vorhandensein eines Glucoserezeptors von sehr breiter Spezifität erklärt werden (9).
2. Trotz Hemmung der Glycolyse durch Jodacetat wird auf Glucosereiz weiterhin Insulin sezerniert, wenn durch Pyruvat die Substratversorgung der β-Zelle gesichert wird (2,10).
3. Trotz Blockierung des Glucosetransportes in die β-Zelle durch Phlorrhizin erfolgt Stimulierung der Insulinsekretion (11).
4. Cytochalasin B, ein kompetitiver Inhibitor des Glucosetransports in Säugetierzellen, verstärkt die glucoseinduzierte Insulinsekretion bei isolierten Inseln von Ratten (12,13,14).
5. Das Einsetzen der Insulinsekretion nach Glucosestimulation erfolgt sofort, während es erst zeitlich versetzt zu einem Anstieg folgender Glucosemetaboliten kommt (9): G-6-P, 6-PG, Fr-1-PP und 3-P-glycerat.
6. Die Stimulation der Insulinfreisetzung durch Glucose erfolgt dosisabhängig (6,7).

Da bisher die Isolierung oder genauere Charakterisierung eines Glucoserezeptors noch nicht gelungen ist, können alle obigen Befunde nur als Hinweise aufgefaßt werden.
Es gibt aber auch Anzeichen dafür, daß ein Metabolit des Glucosemoleküls für das Auslösen des Stimulationsreizes verantwortlich ist:

a) Die Konzentration vieler Metaboliten des Glucoseabbaus läßt sich gut mit der Höhe der glucoseinduzierten Insulinsekretion korrelieren (8,15,16,17,18,19).
b) Viele Kohlenhydrate und Zuckerderivate, bei deren Metabolisierung via Glycolyse oder PPS gleiche Metaboliten wie beim Abbau der Glucose entstehen, stimulieren die Insulinsekretion (6,8,15,16).
c) Metaboliten des Glucoseabbaus können selbst, wenn sie in vitro eingesetzt werden, die Insulinsekretion auslösen (1,3-Dihydroxyaceton (20), D-Glycerinaldehyd (20, 15)).

In den meisten Geweben spielt die Glycolyse im Gegensatz zum PPS bei der Glucose-Utilisation die dominierende Rolle (21).In mehreren endokrinen Drüsengeweben wurde jedoch auf die Bedeutung des PPS für die sekretorischen Prozesse hingewiesen (Nebennierenrinde, Hypophyse, Schilddrüse) (22). Auch für die Langerhanssche Insel wird eine Beziehung zwischen PPS und ihrer sekretorischen Funktion angenommen (23-26). So stimulieren verschiedene Ribosen und Xylitol, die nur über den PPS abgebaut werden können, die Insulinsekretion (27-29).

Die Tatsache, daß foetale Inseln noch keine Aktivität des PPS aufweisen und noch nicht zur Insulinsekretion auf Glucosereiz befähigt sind, ist ebenfalls ein Hinweis auf die mögliche Bedeutung des PPS für die glucoseinduzierte Insulinsekretion (30). Um so mehr, als parallel mit beginnender Aktivität des PPS die Stimulierbarkeit durch Glucose einsetzt.

Weiter konnte gezeigt werden, daß mit einer Verminderung des Glucoseabbaus via PPS durch 6-Aminonicotinamid (einem Antimetabolit der Pyridinnucleotidsynthese (31)) eine Verminderung der glucosestimulierten Insulinsekretion einhergeht (32,33).

Neuere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, daß NADPH ebenfalls zu den glucoseabhängigen Metaboliten zu zählen ist. Der $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotient ist gut mit der Insulinsekretion korrelierbar (34). Ebenfalls glucoseabhängig erfolgte die Steigerung der PPS-Aktivität (35).

Durch Methylenblau, einem Oxidationsmittel für NADPH gelang es, den $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten und parallel dazu die Insulinsekretion zu vermindern (36,37). Die Aktivität des PPS konnte durch exogenes Insulin gesenkt werden, gleichzeitig nahm außer dem $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten auch der $\frac{6\text{-P-G}}{\text{G-6-P}}$ - Quotient ab und es erfolgte eine Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion (38,39).

Im Zusammenhang mit dem Befund, daß im Hungerzustand die glucoseinduzierte Insulinsekretion vermindert ist, wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Erniedrigung des $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten gemessen (34).

Diese oben aufgeführten Befunde lassen vermuten, daß die Bedeutung des PPS bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion in der Bereitstellung von NADPH liegt. Der PPS liefert Ribosen für die Nucleotidsynthese und NADPH als Reduktionsäquivalente für verschiedene enzymatische Reaktionen.

Da NADPH das wichtigste Co-Substrat für die Glutathionreduktase zur enzymatischen Reduktion von GSSG zu GSH darstellt, wäre es denkbar, daß im Falle einer Verminderung des $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten damit auch eine Senkung des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten einhergeht. Es ist daher möglich, daß die bei Hemmung der PPS-Aktivität bzw. Verminderung des $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten beobachtete Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion schließlich auf eine Abnahme des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten zurückgeht.

Hinweise auf diese Theorie liefern Befunde von Ammon et al. (37). Es konnte gezeigt werden, daß durch Diamid[1)] und t-BHP[2)], 2 Substanzen, mit denen in anderen Geweben intrazelluläres GSH oxidiert werden konnte (40,41), die glucoseinduzierte Insulinsekretion gehemmt werden kann. Außerdem ließ sich durch t-BHP und Diamid die p-CMB-induzierte Insulinsekretion hemmen (37).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde gezeigt, daß die Insulinsekretion in vitro mit SH-Reagenzien beeinflußt werden kann (42,43). So führt p-Chlormercuribenzoat vermutlich durch Bildung von Mercaptiden mit SH-Gruppen der β-Zellmembran zur Stimulation der Insulinsekretion (44,45).

1),2) zu den Formeln und Reaktionsmechanismen s. S. 157

Bei alkylierenden Substanzen wie N-Äthylmaleinimid und Jodacetamid, die vermutlich ebenfalls mit freien SH-Gruppen reagieren, wurde ebenfalls eine Stimulation der Insulinsekretion beobachtet (46,47).
Auch von Substanzen, die Thiolgruppen oxidieren bzw. gemischte Disulfide bilden, wie 6-6'-Dithiodinicotinsäure und 5,5'-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure) (Ellman's Reagens), wurde eine Stimulierung der Insulinsekretion berichtet (48).
Aus den mit Thiolreagenzien gewonnenen Ergebnissen läßt sich die Vermutung ableiten, daß Thiolgruppen der β-Zelle bzw. der β-Zellmembran für die Insulinsekretion von Bedeutung sind. Dies setzt jedoch voraus, daß diese SH-Gruppen laufend in reduziertem Zustand gehalten werden müssen, damit eine Stimulierung zur Sekretion von Insulin führen kann.
Von anderen Organen ist bekannt, daß der Redoxzustand des -SH,-SS-Systems vom Redoxstatus des Glutathion abhängig ist (49).

1.2 Fragestellung

Untersuchungen über das Redoxgleichgewicht des insulären GSH-GSSG-Systems und seine Beziehung zur Insulinsekretion liegen nicht vor. Dies nicht zuletzt deswegen, weil bisher noch keine Methode beschrieben wurde, die empfindlich

genug ist, GSH und GSSG getrennt in Gewebemengen von nur 20-50 µg zu bestimmen.

Es war daher Hauptziel der vorliegenden Arbeit, erstens eine Methode zu entwickeln, die genau genug ist, GSH- und GSSG-Gewebespiegel im picomol-Bereich nachzuweisen.

Zweitens wurde in Pankreasinseln GSH und GSSG bestimmt und versucht, Beziehungen zwischen der Höhe der Glucosekonzentration, dem $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten und der glucoseinduzierten Insulinsekretion herzustellen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die durch Glucose induzierte Sekretion von Insulin mit einer Zunahme des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten einhergeht und vermutlich von diesem abhängt.

2. MATERIAL

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wistar-Ratten beiderlei Geschlechts verwendet. Das Körpergewicht lag zwischen 200 und 300 g. Die Tiere wurden in Makrolonkäfigen bei einer Raumtemperatur zwischen 24-26°C und 55-65 % relat. Luftfeuchtigkeit im 12-Stunden Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Als Standard-Diät erhielten sie Altromin der Firma Altrogge, Lage/Lippe und Wasser ad libitum.

2.2 Chemikalien und Enzyme

t-Butylhydroperoxid	Merck-Schuchardt, München
Collagenase	Worthington Biochem. Corp. Freehold, U.S.A.
Diamid	HAG AG, Bremen
Ellmans Reagens	Boehringer, Mannheim
α-D-Glucose	Serva, Heidelberg
Glutathion (oxidiert)	Boehringer, Mannheim
Glutathion (reduziert)	Boehringer, Mannheim
Glutathion-Reduktase	Boehringer, Mannheim
Metaphosphorsäure	Merck AG, Darmstadt
Methanol zur Szintillationsmessung	Merck AG, Darmstadt

Methanol für die Fluoreszenzspektroskopie	Merck AG, Darmstadt
Methylenblau	Fluka, Buchs
N-Äthylmaleinimid	Serva, Heidelberg
NADPH	Boehringer, Mannheim
o-Phthaldialdehyd	Sigma Corp. U.S.A.
Rinderserumalbumin	Behringwerke, Marburg
Triäthanolamin	Merck AG, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Boehringer, Mannheim

Alle nicht genannten Chemikalien in der jeweils reinsten Form (p.a.) stammten von der Firma Merck AG, Darmstadt.

2.3 Nähr- und Reagenzlösungen

2.3.1 Hanks' Lösung (50)

Stammlösung:

NaCl	80	g
KCl	4	g
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	0,76	g
KH_2PO_4	0,60	g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,0	g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,85	g

Aqua dest. ad 1000 ml

Vor Gebrauch wird diese Stammlösung 1 + 9 mit destilliertem Wasser verdünnt und mit 100 mg % Glucose versetzt, um die Substratversorgung der Inseln sicherzustellen. Anschließend wurde die Lösung auf einen pH-Wert(mit $NaHCO_3$-Lösung)von 7,35 eingestellt.

2.3.2 Krebs-Ringer-Bicarbonat (KRB)-Lösung

Die verwendete KRB-Lösung setzte sich nach der Originalbeschreibung von Umbreit et al. (51) folgendermaßen zusammen:

NaCl-Lösung	: 0,90 %	=	(0,154 M)	100 Teile
KCl-Lösung	: 1,15 %	=	(0,154 M)	4 Teile
$CaCl_2$-Lösung	: 1,22 %	=	(0,11 M)	3 Teile
KH_2PO_4-Lösung	: 2,11 %	=	(0,154 M)	1 Teil
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$-Lösung	: 3,82 %	=	(0,154 M)	1 Teil
$NaHCO_3$-Lösung	: 1,30 %	=	(0,154 M)	21 Teile

Zur besseren Haltbarkeit dieser Lösung hat es sich als praktisch erwiesen, drei voneinander getrennte Lösungen folgender Zusammensetzung herzustellen:

Lösung "A" (Stammlösung ohne $NaHCO_3$ und $CaCl_2$)

NaCl	69,2 g
KCl	3,61 g
KH_2PO_4	1,62 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,93 g

gelöst in 1 Liter Aqua dest.

Lösung "B" ($NaHCO_3$-Lösung)

$NaHCO_3$ 21,10 g

gelöst in 1 Liter Aqua dest.

Lösung "C" ($CaCl_2$-Lösung)

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3,73 g

gelöst in 1 Liter Aqua dest.

Diese Lösungen wurden getrennt voneinander bei $+4^oC$ aufbewahrt und vor Gebrauch wie unten angegeben (siehe 2.3.2.1) gemischt.

2.3.2.1 Inkubationslösungen

Die Stammlösungen wurden in folgenden Mengen miteinander gemischt:

Lösung A	10 ml
Lösung B	10 ml
Lösung C	10 ml
Aqua bidest.	70 ml

Anschließend wurde das Lösungsgemisch 5 min lang mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begast. Nach Zugabe und Lösen von 2 % Rinderalbumin wurde der pH-Wert auf 7,35 eingestellt. Zur Vorinkubation wurden 2 ml dieser Lösung mit 20 µl einer Glucoselösung der Konzentration 100 mg/ml versetzt (Endkonzentration 100 mg % Glucose) Zur Hauptinkubation

wurden immer 20 ml dieser KRB-Albumin-Lösung mit den entsprechenden Reagenzlösungen versetzt, um die gewünschte Molarität herzustellen. Von der Glucose-Lösung wurde entsprechend zugegeben. Nach Zugabe der Reagenzien mußte der pH nochmals auf pH 7,35 eingestellt werden.

Im Einzelnen wurden für die in vitro Versuche folgende Lösungen in KRB-Puffer bereitet:

Glucose:	1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml
Methylenblau:	1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml
	mit je 3 mg/ml Glucose
t-Butylhydroperoxid:	0,5 mM, 1,0 mM, 2 mM
	mit je 3 mg/ml Glucose
Diamid:	0,1 mM, 0,5 mM, 1,0 mM
	mit je 3 mg/ml Glucose

Detaillierte Angaben finden sich in den Legenden zu den Tabellen.

2.4 Geräte

Optische Geräte

Spektralphotometer: Doppelstrahl-Spektralphotometer Beckman DB-ST

Zeiss M_4 QII

Zeiss pM 6 mit Drucker XP2

Fluorimeter: Fluoripoint der Fa. Baird-Atomic

Stereomikroskop Nikon SM 6

Zentrifugen

Kühlzentrifugen: Christ UJ II KS und Heraeus Christ
Cryofuge 20-30 mit Rotor Nr. 8760/32x12 ml

weitere Geräte

Gefriertrockenanlage Christ Beta

Schüttelwasserbad Fa. Köttermann

Ultraschalldesintegrator braunsonic 1510

Ultraschallbad Econoclean

Beckman pH-Meter H5

Olivetti Tischcomputer P 602

Whirlmix

3. METHODEN

3.1 Aufstellung einer Mikromethode zur Bestimmung von GSH und GSSG in kleinen Gewebemengen im picomol-Bereich

Aus der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Bestimmungsmethoden für Glutathion (52-60) schienen die folgenden in Bezug auf die Erhöhung ihrer Empfindlichkeit zur Anwendung bei kleinsten Gewebemengen wie Inselgewebe am ehesten geeignet zu sein.

1. Enzymatic cycling mit Ellmans Reagens, Glutathionreduktase und NADPH mit photometrischer Auswertung nach Tietze (56) und Owens und Belcher (55).
2. Fluorimetrische Bestimmung von GSH, GSSG nach Umsetzung mit Orthophthaldialdehyd nach Cohn und Lyle (59) und Hissin und Hilf (60).

3.1.1 Enzymatic cycling

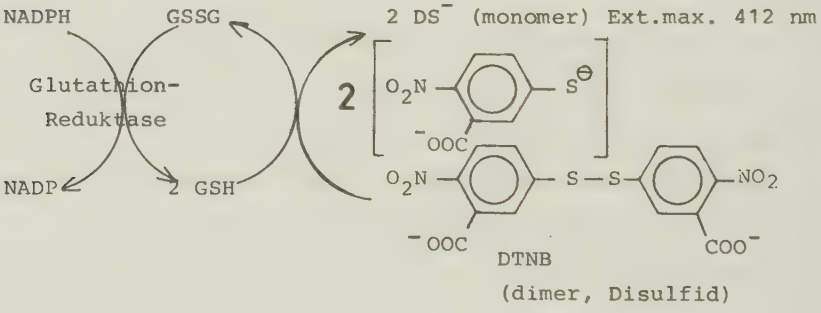
3.1.1.1 Beschreibung der Methode

Zunächst wurde versucht, die von Tietze (1969), Owens und Belcher (1965) beschriebene Methode so weit zu modifizieren, daß eine Bestimmung von GSH und GSSG im Inselgewebe durchgeführt werden konnte.

Das Prinzip der Methode beruht darauf, daß durch einen Cyclingvorgang GSSG laufend enzymatisch reduziert und durch Reaktion mit DTNB wieder oxidiert wird. Dabei entsteht ein farbiges Anion mit einem Extinktionsmaximum bei 412 nm. Bei dieser Reaktion werden GSH und GSSG gleichermaßen erfaßt. GSSG kann aber getrennt dadurch bestimmt werden, daß man GSH mit NEM umsetzt, das danach im Cyclingtest nicht mehr reagiert.

Das Testsystem enthält GSH bzw. GSSG, GSSG-Reduktase, Ellmans Reagens (DTNB), NADPH und Puffer.

Vereinfachtes Reaktionsschema:



Wie aus dem Schema hervorgeht, reagieren 2 Moleküle GSH mit DTNB (Disulfid) und werden zu GSSG oxidiert. DTNB wird zum monomeren Anion (gespalten) reduziert, dessen Extinktionsmaximum bei 412 nm liegt und photometrisch bestimmt wird. Das entstandene GSSG wird unter Verbrauch von NADPH als Co-Substrat der Glutathionreduktase enzymatisch reduziert. NADPH wird zu NADP oxidiert. Das durch Reduktion entstandene GSH reagiert wieder mit DTNB, wird dabei oxi-

diert, enzymatisch unter NADPH-Verbrauch reduziert, reagiert wieder mit DTNB usw. Es handelt sich also um eine enzymatische Cyclingreaktion, bei der sich als Reaktionsprodukte Ellman-Anion und NADP anhäufen. GSH bzw. GSSG gehen als 'Katalysator' in die Reaktion ein. Durch den Cycling-Prozeß wird ein Vielfaches von DTNB-Anion gebildet, als wenn DTNB stöchiometrisch mit GSH reagieren würde.

Nicht eindeutig geklärt ist der genaue Mechanismus der Reaktion. Diskutiert wird, daß folgende Reaktionsschritte ablaufen, bei denen gemischte Disulfide zwischen GSH und Ellman-Anion nach folgender Gleichung gebildet werden (56):

$$\text{GSH} + \text{DSSD} \rightleftharpoons \text{GSSD} + \text{DSH}$$

$$\text{GSH} + \text{GSSD} \rightleftharpoons \text{GSSG} + \text{DSH}$$

Außerdem ist eine enzymatische Reduktion von DTNB aufgrund mangelnder Substratspezifität der Reduktase wahrscheinlich, was die relativ hohen Leerwertreaktionen (blanks) erklären würde.

$$\text{DSSD (= DTNB)} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{GR}} 2\ \text{DSH} + \text{NADP}$$

Bei Anwendung des Tests auf hohe GSH-Konzentrationen (Mikrogrammbereich) können die Leerwerte vernachlässigt werden, weil vermutlich für das Enzym genügend 'Originalsubstrat' GSSG angeboten wird und DTNB deshalb vom Enzym wesentlich langsamer umgesetzt wird.

Unklar ist außerdem, ob nach der Gleichung (1)

$$GSH + DSSD \rightleftharpoons GSSD + DSH \qquad (1)$$

entstandenes gemischtes Disulfid GSSD enzymatisch reduziert wird (2) (das Enzym GR kann auch gemischte Disulfide umsetzen (61,62)) oder nichtenzymatisch mit GSH reagiert (3).

$$GSSD + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} GSH + DSH + NADP \qquad (2)$$

oder

$$GSSD + GSH \rightleftharpoons GSSG + DSH \qquad (3)$$

3.1.1.2 Durchführung nach Tietze

Lösungen:

Sofern in den einzelnen Reaktionsansätzen nicht anders erwähnt, wurde folgender Puffer verwendet: 0,1 M Phosphat/ 0,005 M EDTA pH 7,1. Alle Lösungen wurden, wenn es zu speziellen Untersuchungen nicht anders erforderlich und bei der Beschreibung der Reaktionsansätze nicht angegeben war, in oben beschriebenem Puffer hergestellt.

Der Ansatz enthielt:

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
Phosphat/EDTA Puffer pH 7,1	900 µl	0,1 M/0,005 M
GSH/GSSG-Mischung 1:1	50 µl	0-500 ng/ml
DTNB (30 mM)	20 µl	0,6 mM
Glutathion-reduktase (1 mg/ml)	10 µl	10 µg/ml

Anschließend wurde am Photometer bei der Wellenlänge von 412 nm die Extinktion auf null justiert. Durch Zugabe von 20 µl einer NADPH Lösung (0,2 µmol/20 µl in Phosphatpuffer pH 7,1)wurde die Reaktion gleichzeitig mit dem Einschalten der Stoppuhr gestartet. Als Leerwert wurde anstelle der GSH/GSSG-Eichlösung 50 µl Puffer einpipettiert. Nach 6 min wurde die neue Extinktion abgelesen.
Die Ext./6 min wurden in ein Schaubild auf der Ordinate und die Konzentration an GSH/GSSG auf der Abszisse eingetragen.
Beispiel für eine Eichkurve 0-500 ng/ml:

GSH/GSSG-Mischung 1:1 ng/ml	Ext./6 min
0	0,08
50	0,16
100	0,24
150	0,3
200	0,4
350	0,625
500	0,85

Tabelle 1: Abhängigkeit der Extinktionszunahmen/6 min von GSH und GSSG (Mischung 1:1) in der Durchführung nach Tietze.

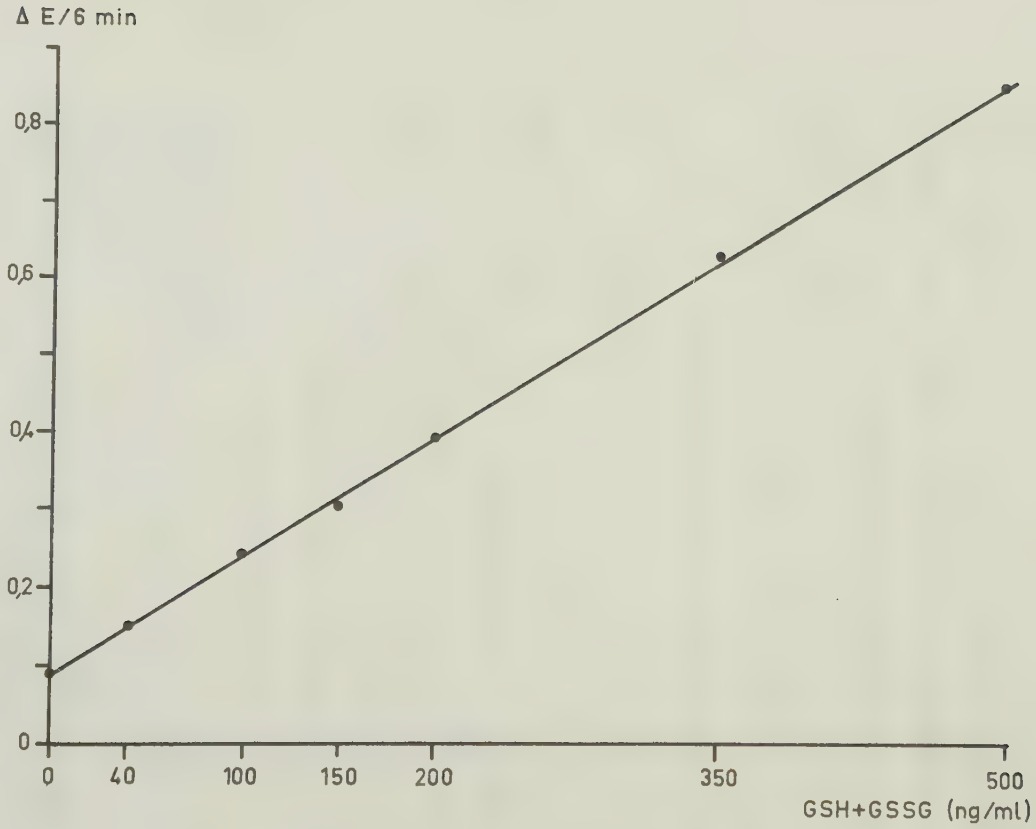


Abb. 1: Abhängigkeit der Extinktionszunahme/6 min von GSH und GSSG für eine Mischung aus GSH + GSSG (1:1) zwischen 0 und 500 ng/ml. Reaktionsansatz siehe Text.

Für die Anwendung auf Inseln war der Test in dieser Modifikation nicht empfindlich genug. Bei einem Inkubationsansatz von 5 Inseln/ml stehen bei einem durchschnittlichen Inselgewicht von 2-10 µg/Insel etwa 10-50 µg Gewebe zur Verfügung. Die Konzentration in verschiedenen Geweben beträgt zwischen 0,5-10 µMol Glutathion/g Gewebe (65). Bei einem mittleren Gehalt sind ungefähr 6 ng Gesamtglutathion in 40 µl des später einzusetzenden Zentrifugenüberstandes (3.2.5) zu erwarten.

Aus der Steigung der Eichkurve läßt sich erkennen, daß Konzentrationen unter 50 ng/ml mit der Methode wie sie oben durchgeführt wurde, nicht genau zu bestimmen sind. Die Extinktionsunterschiede zwischen 0 und 50 ng/ml betragen nur 0,08 (Tabelle 1, Abb. 1).

Um die Empfindlichkeit des Tests zu steigern, wurden folgende Variationen versucht:

1. Verlängerung der Cyclingzeit
2. Veränderung der Enzymkonzentration
3. Veränderung der DTNB-Konzentration
4. Veränderung des Puffers
5. Erhöhung der Reaktionstemperatur
6. Verwendung verschiedener Säuren zur Eiweißfällung
7. Umstellung auf Serienmessung

3.1.1.3 Modifikation der enzymatic-cycling Methode

3.1.1.3.1 Verlängerung der Cyclingzeit (Untersuchung zur Kinetik der Reaktion)

Da es sich nicht um eine Endpunktbestimmung, sondern um eine kinetische Messung handelt, kann durch Verlängerung der Cyclingzeit infolge Erhöhung der Konzentration des Reaktionsendproduktes die Extinktionszunahme vergrößert werden. Dazu mußten folgende Fragen geklärt werden:
Wie lange nimmt unter den bisherigen Bedingungen die Extinktion zu? Wo gibt es hier lineare Bereiche im Verlauf der Extinktionszunahme? Kann durch Erhöhung der Konzentration eines der Reaktionspartner, die im Verlauf der Reaktion verbraucht werden, die Reaktionszeit verlängert werden?
Die Reaktion kommt theoretisch erst dann zum Stillstand, wenn eines der Substrate verbraucht ist. Verbraucht werden bei der Reaktion DTNB und NADPH. Die GSSG-Konzentration ist für den Endpunkt der Reaktion nicht limitierend, da die stationäre Konzentration dauernd aufrechterhalten wird, d.h. GSSG wird trotz dauernder enzymatischer Reduktion nicht verbraucht, weil durch Umsetzung von GSH mit DTNB laufend wieder GSSG entsteht.
Zur Klärung dieser Fragen wurde in einem Beckmann Spektral-Photometer mit Schreiber der zeitliche Verlauf aufgezeichnet (Abb. 2). In der Küvette befand sich das auf S.17 angeführte Reaktionsgemisch mit 5 ng GSSG/ml.

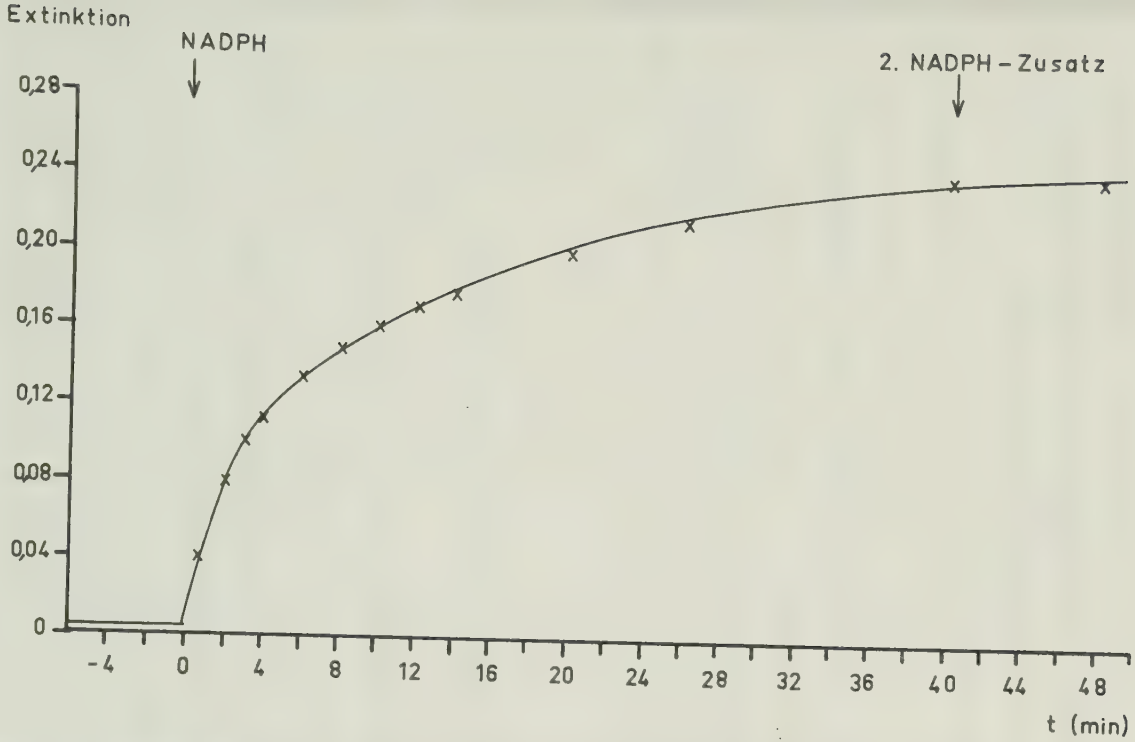


Abb. 2: Abhängigkeit der Extinktionszunahme von der Zeit für GSSG (5 ng/ml). Start der Reaktion durch NADPH-Zugabe zum Zeitpunkt 0; 2. NADPH-Zugabe nach 40 min. Reaktionsansatz siehe Text.

Nach 40 min, als der Kurvenverlauf deutlich flacher wurde, sollte untersucht werden, ob durch erneute Zugabe von 10 µl NADPH (10 mM) die Reaktion nochmals in Gang gesetzt werden kann und dadurch eine stärkere Extinktionszunahme zu erreichen ist, was die Ablesbarkeit und damit die Empfindlichkeit erhöhen würde.
Wie die Abb. 2 zeigt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 0 und 20 min am größten, während sie nach mehr als 40 min praktisch zum Stillstand kommt und auch durch erneute NADPH Zugabe nicht mehr erhöht werden kann.
Daraus ergibt sich, daß eine Reaktionsdauer von höchstens 30 min ausreicht, weil sonst die Extinktionszunahme nicht mehr proportional der GSH- bzw. GSSG-Konzentration zu sein scheint.

3.1.1.3.2 Variation der Enzymkonzentration

Die Reaktionsgeschwindigkeit und damit die Extinktionszunahme hängt von der Konzentration der beteiligten Substrate ab. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional den Konzentrationen von GR, DTNB, GSSG und NADPH.

$V \sim [GR]\ [DTNB]\ [GSSG]\ [NADPH]$

Wenn DTNB und NADPH so weit im Überschuß vorliegen, daß ihre Konzentration annähernd konstant bleibt, gilt $V \sim [GR]\ [GSSG]$ aber nur, wenn die Konzentration von [GSSG] unterhalb des k_M-Wertes für GR liegt. Dann ist die Extinktionszunahme bei konstanter GR-Konzentration proportional [GSSG] bzw.

linear von [GSSG] abhängig. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist also bei Konstanthaltung der Konzentration von DTNB und NADPH sowohl von der Enzymkonzentration als auch von [GSSG] abhängig. Folglich konnte durch Erhöhung der Enzymkonzentration die Extinktionszunahme vergrößert werden, was aber nur sinnvoll ist, wenn die Extinktionen der Leerwerte nicht im gleichen Maße mit ansteigen.

Es wurde folgender Ansatz gewählt:

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
Phosphat/EDTA-Puffer pH 7,1	900 µl	0,1 M/0,005 M
GSSG (5 ng/50 µl)	50 µl	5 ng/ml
DTNB (10 mM)	20 µl	0,2 mM
NADPH (10 mM)	20 µl	0,2 mM
GR (250, 500, 1000 µg/ml)	10 µl	2,5/5,0/10 µg/ml

Nach der von Tietze (56) angegebenen Vorschrift wird die Cycling-Reaktion mit einer Enzymkonzentration von 10 µg/ml GR durchgeführt.

Die gemessenen Extinktionen/10 min betrugen (Mittelwerte aus 4 Messungen) (siehe auch Abb. 3):

GR µg/ml	Extinktion/10 min GSSG 5 ng/ml	Leerwert	Ext. Leerwert in % der Ext. 5 ng GSSG
2,5	0,14	0,08	57 %
5	0,28	0,2	71 %
10	0,56	0,4	71 %

Tabelle 2: Abhängigkeit der Extinktionszunahme/10 min von der Enzymkonzentration für 5 ng GSSG/ml und den Leerwert.

Wie die Abb. 3 zeigt, nimmt die Extinktion mit steigender Enzymkonzentration zu, d.h. die Reaktionsgeschwindigkeit kann durch Erhöhung der Enzymkonzentration gesteigert werden. Die Extinktionen der Leerwerte steigen ebenfalls, sind aber bei 2,5 µg/ml GR am geringsten (prozentual und absolut). Da außerdem bei erhöhter Reaktionsgeschwindigkeit technisch bedingte Meßfehler stärker ins Gewicht fallen, weil die Reaktionszeit sehr genau eingehalten werden muß, scheint eine Enzymkonzentration von 2,5 µg/ml am geeignetsten zu sein. Diese Konzentration an GR wurde deshalb für die Glutathionbestimmung in Pankreasinseln verwendet.

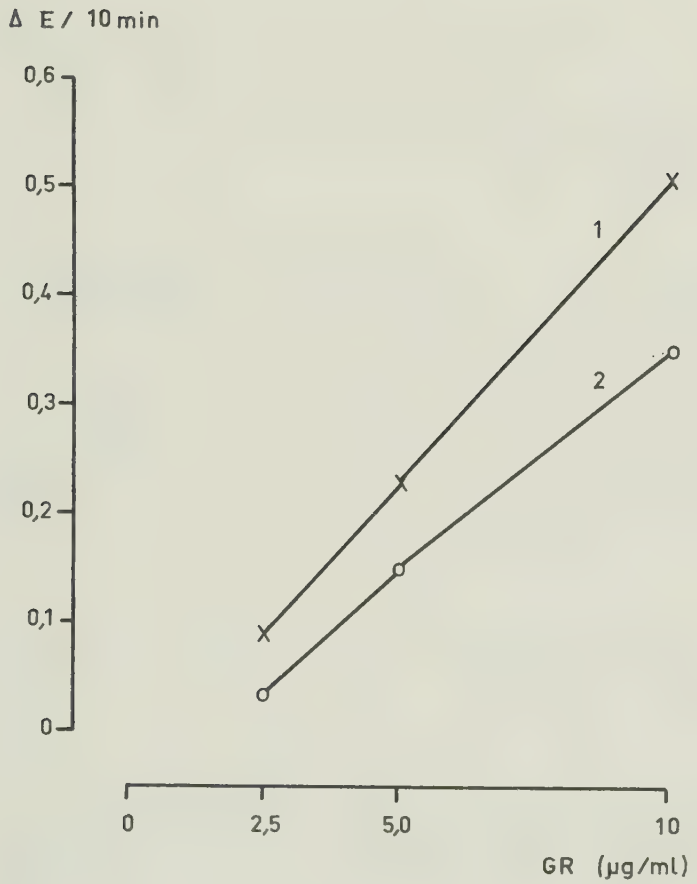


Abb. 3: Abhängigkeit der Extinktionszunahme/10 min von der Enzymkonzentration für
1) GSSG (5 ng/ml)
2) Leerwert
Reagenzkonzentrationen vgl. im Text.

3.1.1.3.3 Variation der Konzentration an DTNB

Durch Veränderung der DTNB-Konzentration sollte untersucht werden, ob die Extinktionen für GSSG erhöht bzw. die Extinktionen der Leerwerte gesenkt werden können. Dazu diente folgender Ansatz:

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
Phosphat/EDTA-Puffer pH 7,1	900 µl	0,1 M/0,005 M
GSSG (10 ng/50 µl)	50 µl	10 ng/ml
GR (250 µg/ml)	10 µl	2,5 µg/ml
NADPH (10 mM)	20 µl	0,2 mM
DTNB (10, 30, 60 mM)	20 µl	0,2/0,6/1,2 mM

Es wurden folgende Extinktionen/10 min gemessen (Mittelwert aus 3 Messungen):

DTNB mM	Extinktion/10 min		Ext. Leerwert in % der Ext. 10 ng GSSG
	GSSG 10 ng/ml	Leerwert	
0,2	0,33	0,13	40 %
0,6	0,73	0,46	63 %
1,2	0,1	0,095	-

Tabelle 3: Abhängigkeit der Extinktionszunahme/10 min von der DTNB-Konzentration für 10 ng GSSG/ml und Leerwert. Reagenskonzentrationen im Text.

Wie die Abb. 4 zeigt, ergab sich für 0,6 mM DTNB die größte Extinktionszunahme, allerdings auch die höchsten Leerwert-Extinktionen. Sie betrugen 64 % der für 10 ng GSSG erhaltenen Extinktionen und bei 0,2 mM DTNB aber nur 40 %. Eine weitere Erhöhung auf 1,2 mM verlangsamte die Reaktion. Das Enzym scheint durch DTNB in dieser Konzentration gehemmt zu werden. Von Mize et al. (63) wurde eine Hemmung der GR durch SH-Reagenzien beschrieben. Weil bei 0,2 mM DTNB das Verhältnis von Proben-Extinktion und Leerwert-Extinktion am günstigsten war, wurde diese Konzentration für die weiteren Versuche beibehalten.

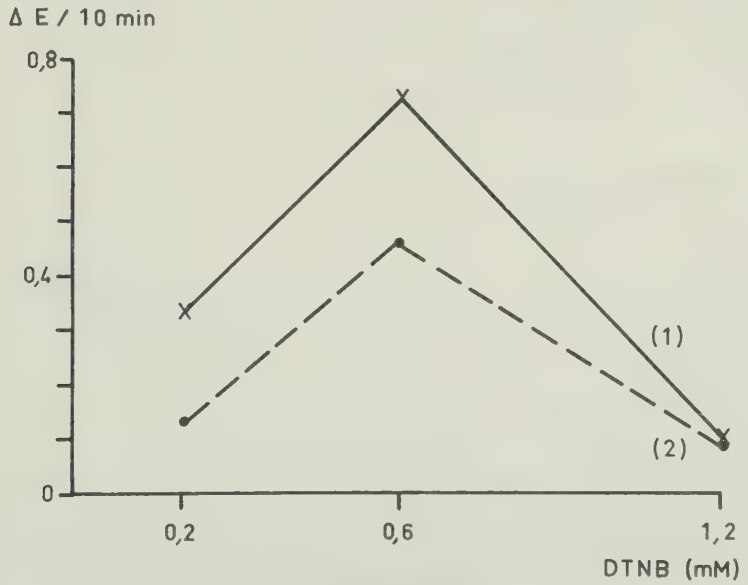


Abb. 4: Abhängigkeit der Extinktionszunahme/10 min von der DTNB-Konzentration für 10 ng GSSG/ml (1) und Leerwert (2). Reagenskonzentrationen im Text.

3.1.1.3.4 Wahl eines geeigneten Puffers

Durch Anwendung verschiedener Puffer wurde versucht, die Enzymaktivität und damit die Empfindlichkeit des Tests zu steigern. Der optimale pH-Bereich für die Glutathionreduktase liegt zwischen pH 7,0 und 9,0 (64), der für die Umsetzung von DTNB mit Thiol-Gruppen zwischen 7,0 und 8,0 (55).

Folgende Puffer, die alle EDTA (15 mM) enthielten und auf pH 7,1 eingestellt waren, wurden eingesetzt:
Puffer 1: Phosphat-Puffer (110 mM Na_2HPO_4, 40 mM NaH_2PO_4)
Puffer 2: Imidazol-Puffer (35 mM Imidazol, 15 mM Imidazol·HCl)
Puffer 3: Triäthanolamin-Puffer (100 mM Triäthanolamin)
Puffer 4: Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl)

Der Reaktionsansatz enthielt:

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
Puffer	400 µl	siehe Text
DTNB (5 mM)	20 µl	0,2 mM
GR (125 µg/ml)	10 µl	2,5 µg/ml
GSSG (100 ng/50 µl)	50 µl	100 ng/500 µl
NADPH (5 mM)	20 µl	0,2 mM

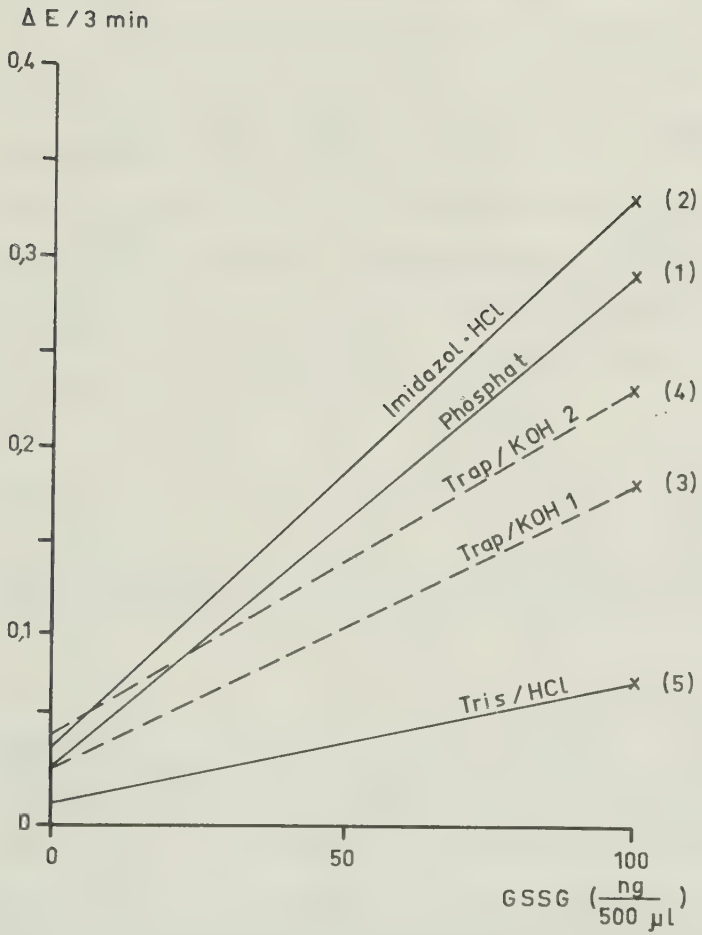


Abb. 5: Abhängigkeit der Extinktionszunahme/3 min von der GSSG-Konzentration in verschiedenen Puffern für Leerwert und GSSG 100 ng/500 µl. Eingesetzte Puffer:
1. Phosphatpuffer
2. Imidazolpuffer
3. Triäthanolamin-Puffer 1. Messung
4. Triäthanolamin-Puffer 2. Messung
5. Tris-Puffer
Einzelheiten zum Reaktionsansatz im Text.

Die Messung ergab folgende Extinktionen/3 min (Mittelwert aus 4 Messungen) (vgl. auch Abb. 5):

Puffer	Extinktionen/3 min	
	GSSG 100 ng/500 µl	Leerwert
1. Phosphat	0,29	0,03
2. Imidazol	0,33	0,040
3. Triäth. 1. Messung	0,18	0,03
2. Messung	0,23	0,05
4. Tris	0,076	0,01

Tabelle 4: Abhängigkeit der Extinktionszunahme/3 min von verschiedenen Puffern für Leerwert und GSSG 100 ng/500 µl.

Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, ist die Reaktionsgeschwindigkeit im Imidazol- und Phosphat-Puffer am größten, in Tris-HCl am geringsten. Die Messungen mit Triäthanolamin-Puffer ergaben sehr unterschiedliche Werte, weshalb dieser Puffer für die Ausführung der Cycling-Reaktion ungeeignet zu sein scheint.

Für die weiteren Versuche wurde deshalb in Anlehnung an die Originalvorschrift von Tietze (56) 0,1 M Phosphat/ 0,005 M EDTA Puffer verwendet.

3.1.1.3.5 Erhöhung der Reaktionstemperatur

Um zu untersuchen, ob durch Temperaturerhöhung im Reaktionsansatz die Reaktionsgeschwindigkeit und damit die Extinktionszunahme gesteigert werden konnte, wurde die Abhängigkeit der Extinktionszunahme von der GSSG-Konzentration nach enzymatic cycling bei Zimmertemperatur (20°C, nicht thermostatiert) mit der nach cycling bei 37°C (im Wasserbad thermostatiert) verglichen.
Dazu wurde folgender Ansatz gewählt:

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
Phosphat/EDTA-Puffer pH 7,1	400 µl	0,1 M/0,005 M
GSSG (0-20 ng/50 µl)	50 µl	0-20 ng/500 µl
GR (125 µg/ml)	10 µl	2,5 µg/ml
DTNB (5 mM)	20 µl	0,2 mM
NADPH (5 mM)	20 µl	0,2 mM

Wie die Tabelle 5 und die Abb. 6 zeigen, konnte durch Ausführung der Reaktion bei 37°C die Extinktionszunahme und damit die Empfindlichkeit gesteigert werden. Außerdem ergab sich, daß bei Konstanthaltung der Temperatur die Streuung der Meßwerte vermindert war. (Der Regressionskoeffizient für die Meßreihe nach Reaktion bei 37°C ist höher als der nach Reaktion bei Zimmertemperatur).

GSSG ng/500 µl	Extinktion/20 min 37°C	Extinktion/20 min Zimmertemperatur
0	0,255 0,269	0,3 0,28
1,25	0,34 0,35	0,34 0,37
2,5	0,24 0,43 0,42	0,375 0,42
3,75	0,49 0,5	0,42 0,45 0,47
5,0	0,575 0,58 0,57	0,51 0,51 0,48
7,5	0,725 0,73	0,6 0,59
10,0	0,88 0,9	0,71 0,68 0,72
15	1,18 1,17	0,9 0,93
20	1,49 1,48 1,54	1,13 1,08 1,01
Regressionskoeffizient:	0,9995	0,9948

Tabelle 5: Einfluß der Reaktionstemperatur auf die Extinktionszunahmen für(GSSG 0-20 ng/500 µl) bei 37°C und bei Zimmertemperatur.

Für die Versuche mit Pankreasinseln, bei denen sich ein Meßbereich zwischen 5 und 10 ng Gesamtglutathion/Ansatz als sinnvoll erwies, wurde die Reaktion bei einer Temperatur von 37°C ausgeführt.

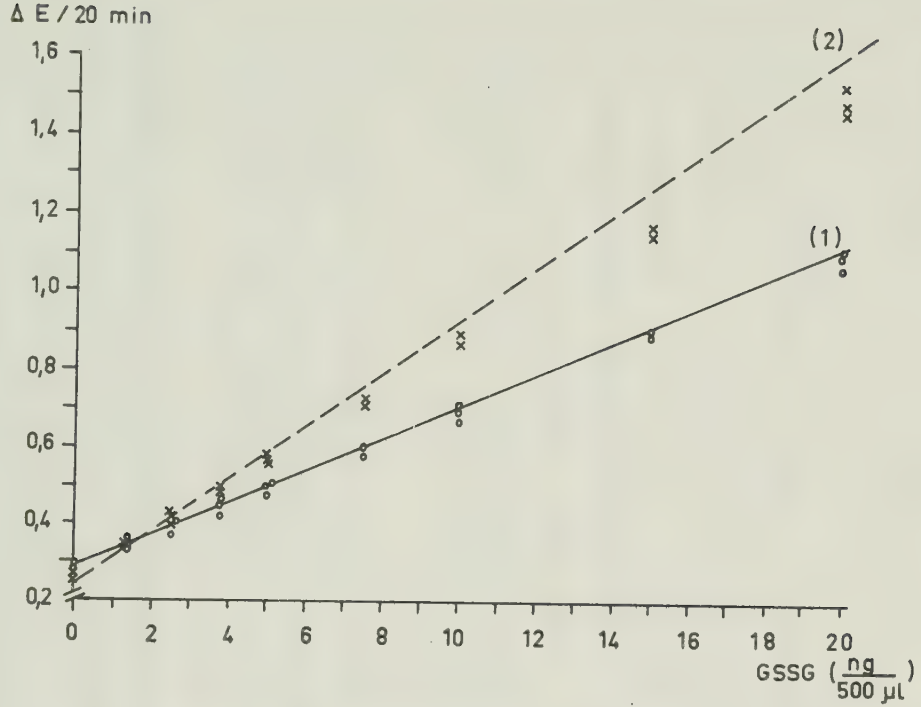


Abb. 6: Einfluß der Reaktionstemperatur auf ΔE/20 min für eine GSSG-Standardlösung (0-20 ng/500 ul)
1) Ausführung bei 20°C
2) Ausführung bei 37°C thermostatiert
Reaktionsansatz siehe Text.

3.1.1.3.6 Untersuchungen zur Auffindung der geeignetsten Säure für die Denaturierung des Gewebsproteins

In der Literatur werden verschiedene Enteiweißungsmittel für die Gewebsaufbereitung zur Glutathion-Bestimmung beschrieben.
Enzymaktivitäten sind häufig in starkem Maße von der Konzentration bestimmter Ionen abhängig. Auch von der Glutathionreduktase wurde eine Hemmbarkeit, abhängig von der Ionenkonzentration, beschrieben (63). Nachdem jetzt der geeignete Puffer feststand, nämlich Phosphat (Na_2HPO_4/ NaH_2PO_4), sollte geprüft werden, ob die Aktivität der Glutathionreduktase möglicherweise von der Art der zur Denaturierung des Gewebsproteins verwendeten Säure abhängt.
Geprüft wurden:

3 %ige MPA, mit 15 %iger Na_3PO_4-Lösung neutralisiert
1 %ige MPA, mit 15 %iger Na_3PO_4-Lösung neutralisiert
1,2 n $HClO_4$ mit 15 %iger Na_3PO_4-Lösung neutralisiert
10 %ige TCA mit Tris neutralisiert.

Von jeder dieser Lösungen wurde mit GSSG eine Verdünnungsreihe hergestellt, die folgende Konzentrationen enthielt: 0, 25, 50, 100 ng GSSG/50 µl. Davon wurden 50 µl in folgenden Reaktionsansatz eingesetzt:

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
Phosphat/EDTA-Puffer	1,0 ml	0,1 M/0,005 M
DTNB (11 mM)	20 µl	0,2 mM
GR (275 µg/ml)	10 µl	2,5 µg/ml
GSSG (0-100 ng/50 µl)	50 µl	0, 25, 50, 100 ng/1100 µl
NADPH (11 mM)	20 µl	0,2 mM

Es wurden folgende Extinktionen/6 min gemessen:

Eingesetzte Lösung	Leerwert	25 ng GSSG	50 ng GSSG	100 ng GSSG /1100 µl
MPA 1 %	0,039	0,078	0,117	0,191
MPA 3 %	0,035	0,069	0,107	0,18
TCA	0,03	0,061	0,094	0,158
$HClO_4$	0,033	0,066	0,097	0,164

Tabelle 6: Einfluß von zur Enteiweißung verwendeter Säuren auf die GSSG-Bestimmung.

Wie der Abb. 7 zu entnehmen ist, fanden sich bei Verwendung von TCA/Tris die geringsten Extinktionszunahmen. Da sich mit MPA die stärksten Extinktionszunahmen ergaben, scheint

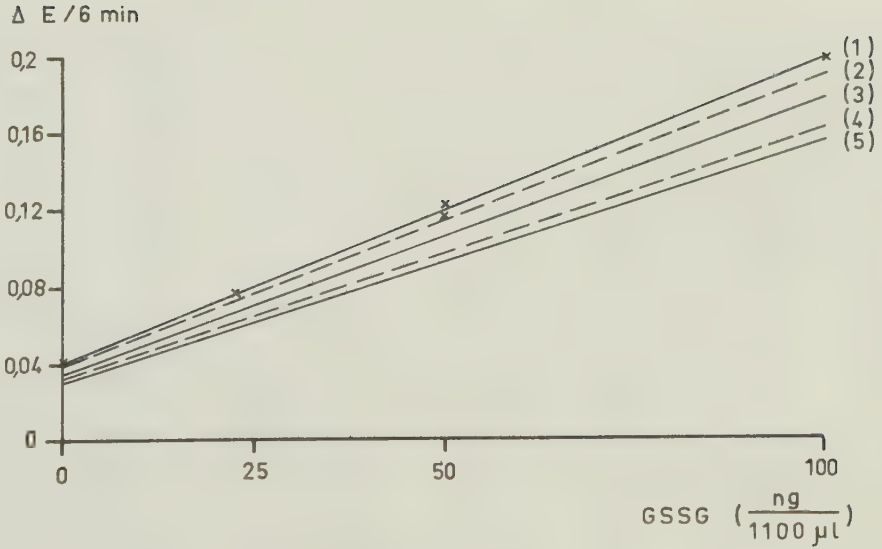


Abb. 7: Einfluß von zur Enteiweißung verwendeter Säuren auf die GSSG-Bestimmung (0-100 ng/1100 µl). GSSG wurde dabei in H_2O und in verschiedenen Säuren gelöst

1) H_2O
2) MPA 1 %
3) MPA 3 %
4) $HClO_4$
5) TCA

Einzelheiten im Text.

diese Säure zur Proteindenaturierung am ehesten geeignet zu sein.

Nachdem sich Metaphosphorsäure als geeignetes Denaturierungsmittel herausgestellt hatte, mußte jetzt untersucht werden, ob diese Säure auch zur Erstellung der Eichkurve verwendet werden muß, weil nicht auszuschließen ist, daß die mit der Probenlösung in das Testsystem gelangten Ionen das Testsystem beeinflussen. Zur Klärung dieser Frage wurden zwei GSSG-Verdünnungsreihen hergestellt:

1. GSSG zwischen 0 und 20 ng/50 µl in H_2O
2. GSSG zwischen 0 und 20 ng/50 µl in 3 % MPA, die mit 15 % Na_3PO_4-Lösung neutralisiert war.

Aus diesen Lösungen wurden nach folgendem Ansatz 2 Eichkurven erstellt.

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
Phosphat/EDTA-Puffer pH 7,1	400 µl	0,1 M/0,005 M
DTNB (5 mM)	20 µl	0,2 mM
GR (125 µg/ml)	10 µl	2,5 µg/ml
GSSG (0-20 ng/50 µl)	50 µl	0-20 ng/Ansatz
NADPH (5 mM)	20 µl	0,2 mM

Wie die Abb. 8 zeigt, liegen die Extinktionen/20 min und damit die Eichkurve, die unter Verwendung von destilliertem

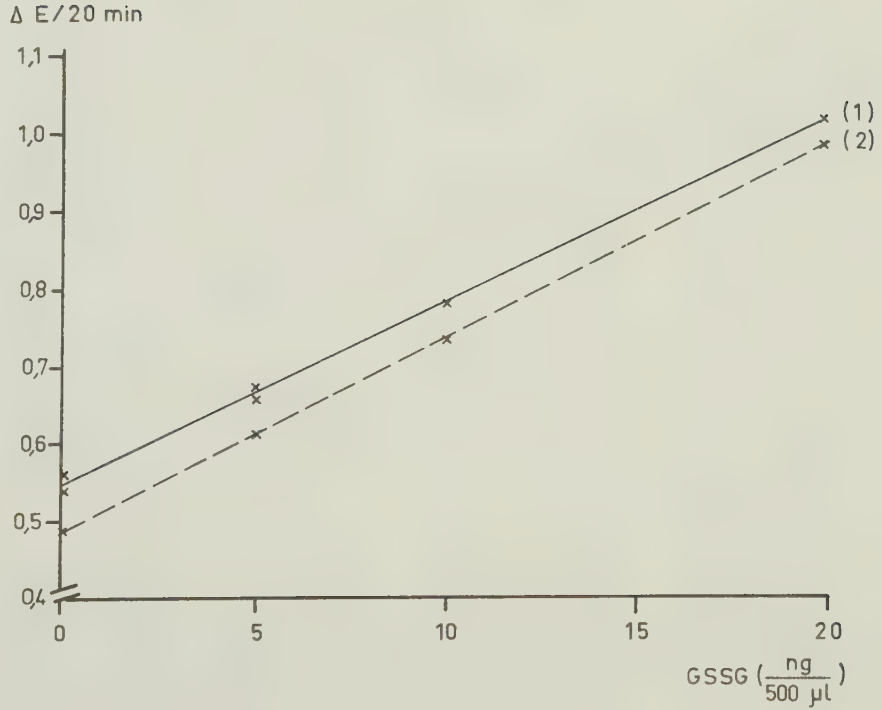


Abb. 8: Einfluß der Ionenkonzentration auf die Ausführung der GSSG-Eichkurve (GSSG 0-20 ng/500 µl)
1) GSSG gelöst in H_2O
2) GSSG gelöst in 3 % MPA/Na_3PO_4

Wasser als Lösungsmittel erstellt wurde, deutlich über der bei Anwesenheit von MPA/Na_3PO_4. Da die Untersuchung der Glutathion-Konzentration in Geweben immer die Eiweißdenaturierung voraussetzt und daher in diesen Fällen jeweils MPA eingesetzt werden muß, ergibt sich notwendig, daß auch bei der Anfertigung der Eichkurve MPA als Lösungsmittel für den GSSG-Standard verwendet werden muß.

3.1.1.3.7 Umstellung auf Serienmessung

Nach Verlängerung der Reaktionszeit auf 20 min erwies es sich als vorteilhaft, den Test derart umzustellen, daß die Messung einer großen Anzahl von Proben in Reihe ermöglicht wird. Nach Tietze läuft die Reaktion in der Küvette ab, und nach 6 min wird die Extinktion abgelesen. Bei verlängerter Reaktionsdauer würde das Messen einer Probe 20 min dauern, was die Bestimmung größerer Serien nicht zuläßt.

Zur Zeitersparnis wurden die Reagenzien im Puffer (s.S. 17) gelöst und die Reaktion in Reagenzgläsern von 1,0 ml Volumen, die im Wasserbad bei 37°C thermostatiert wurden, ausgeführt.
Folgende Lösungen wurden hergestellt:

Lösung 1:	0,1 M Phosphat/0,005 M EDTA-Puffer pH 7,1 mit GR 250 µg/100 ml und DTNB 0,02 mmol/100 ml
Lösung 2:	0,1 M Phosphat/0,005 M EDTA-Puffer pH 7,1 mit NADPH 0,047 mmol/10 ml
GSSG-Standard:	Von GSSG wurde eine Verdünnungsreihe in 3 % MPA, die mit 15 % Na_3PO_4 auf pH 7,1 eingestellt war, hergestellt

Zuerst wurden 50 µl des GSSG-Standards einpipettiert, anschließend 400 µl der Lösung 1 und 5 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Dann wurden nacheinander im Abstand von 30 sec (Stoppuhr!) 20 µl der Lösung 2, die ebenfalls auf 37°C thermostatiert war, zugegeben, mit dem Whirlmix gemischt und wieder ins Wasserbad gestellt. Nach 20-minütiger Reaktionsdauer wurde nacheinander im Abstand von 30 sec die Extinktion jeder Probe gemessen.

Wie aus Abb. 9 hervorgeht, ergab sich auch bei Ausführung der Methode als Serienmessung, wobei die Cycling-Reaktion der einzelnen Proben im Abstand von 30 sec gestartet und gemessen wurde, eine lineare Abhängigkeit der Extinktionszunahme von der GSSG-Konzentration (0-15 ng/470 µl).

Bei einer Anzahl von 40 Proben und somit einer Reaktionszeit von 20 min erwies sich die Serienmessung als praktisch durchführbar.

Um zu prüfen, ob die Serienmessung auch bei einer großen Anzahl von Proben, wobei sich die Reaktionszeit auf über 20 min hinaus verlängern würde, zu exakten Ergebnissen führt, wurde die Stabilität der Reagenslösung untersucht. Dazu wurde der Meßvorgang mit denselben Lösungen, mit denen die 1. Messung durchgeführt wurde, 2 Stunden später wiederholt. Wie die Abb. 9 zeigt, sind die Extinktionen der 2. Messung insgesamt etwa um 0,2 Einheiten höher, was daher rühren könnte, daß sich Ellmans' Reagens in Lösung zusammen mit GR langsam zersetzt. Daraus ergibt sich

1. daß eine Meßserie nicht mehr als 40 Proben enthalten sollte.
2. für jede einzelne Serie, auch wenn sie mit denselben Reagenslösungen durchgeführt wird, muß eine neue Eichkurve aufgestellt werden.

3.1.1.3.8 Arbeitsvorschrift für die Mikrobestimmung von Gesamtglutathion in Geweben

Die unter 3.1.1.3 beschriebenen Untersuchungen zur Erhöhung der Empfindlichkeit der Methode haben zusammengefaßt folgendes ergeben:

1. Durch Verminderung der GR-Konzentration im Ansatz konnte eine prozentuale Erniedrigung der Leerwertextinktion erreicht werden.

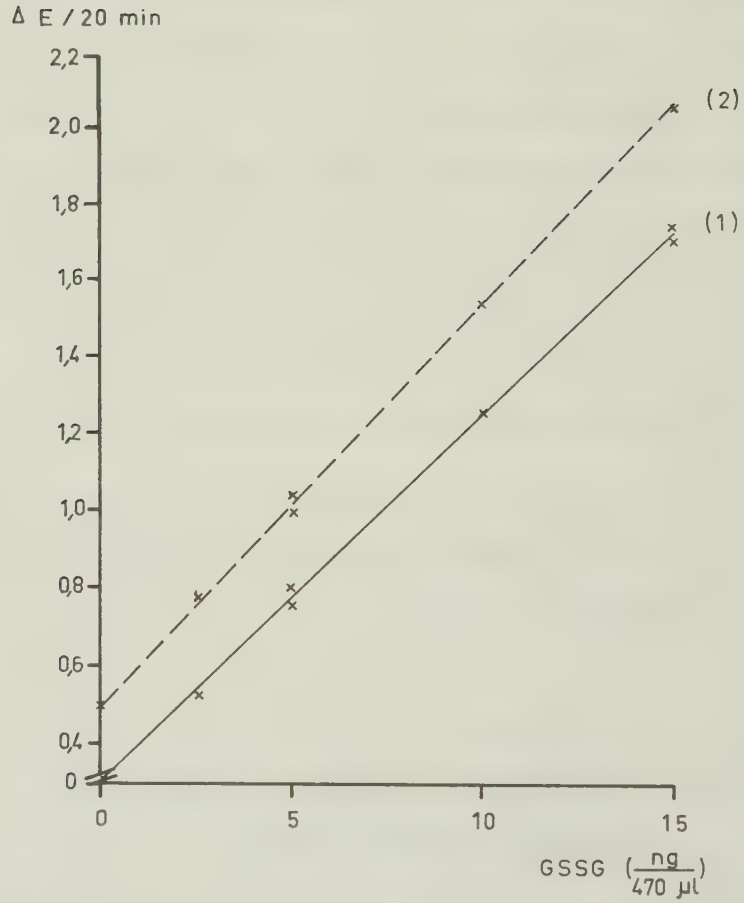


Abb. 9: Abhängigkeit der Extinktionszunahme/20 min von GSSG (0-15 ng/470 µl) mit gleichen Reagenzlösungen im Abstand von 2 Stunden nacheinander gemessen.
1) 1. Messung
2) 2. Messung 2 Stunden später
Einzelheiten zum Reaktionsansatz befinden sich im Text.

2. Die Extinktion des Leerwerts konnte ebenfalls durch Herabsetzen der Konzentration an DTNB vermindert werden.
3. Eine Verlängerung der Reaktionszeit bewirkte eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit der Methodik.
4. Durch die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 37°C konnten stärkere Extinktionszunahmen, durch Konstanthalten der Temperatur im Wasserbad eine Verringerung der methodischen Streuung erreicht werden.

Unter Berücksichtigung der Punkte 1-4 wurde folgende Arbeitsvorschrift zur serienmäßigen Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes in Gewebemengen im Mikrogrammbereich erstellt.

40 µl Zentrifugenüberstand des Gewebehomogenates (siehe 3.2.5) wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß mit 20 µl 15 % Na_3PO_4-Lösung neutralisiert und im Wasserbad thermostatiert. Anschließend wurden 400 µl von der Cycling-Reagenslösung 1 (siehe 3.1.1.3.7) und dann im Abstand von 30 sec (Stoppuhr) 20 µl Reagenzlösung 2 (siehe 3.1.1.3.7), die beide ebenfalls auf 37°C thermostatiert waren, einpipettiert. Nach genau 20 min wurden die Extinktionen der Proben, wieder im Abstand von 30 sec, im Photometer gemessen.

Zur Erstellung der Eichkurve wurden Lösungen mit Konzentrationen zwischen 0 und 20 ng GSSG/40 µl MPA hergestellt und genau wie die Probenlösungen mit unbekanntem Gehalt behandelt.

3.1.1.4 Anwendung der modifizierten Mikromethode auf Rattenblut und Rattenleber

Nach Untersuchungen zur Methodik sollte jetzt überprüft werden, ob diese auch zur Bestimmung von Glutathion in Geweben anwendbar ist.
Es wurde zunächst der Gehalt an Gesamtglutathion von solchen Organen bestimmt (Leber, Blut), von denen in der Literatur ausreichend Angaben über dessen Konzentration vorliegen. Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen.

Rattenblut:

0,1 ml Rattenblut wurden in 9,9 ml eiskaltem 0,01 M Phosphat/EDTA-Puffer hämolysiert. Davon wurden 50 µl in folgenden Testansatz eingesetzt:

Lösungen	Volumen	Endkonzentration
Phosphat/EDTA-Puffer pH 7,1	400 µl	0,1 M/0,005 M
DTNB (5 mM)	20 µl	0,2 mM
GR (125 µg/ml)	10 µl	2,5 µg/ml
Probenlösung	50 µl	
NADPH (5 mM)	20 µl	0,2 mM

Die Bestimmung ergab 280 $\pm$ 4,9 µg Gesamtglutathion/ml Blut. (Mittelwert $\pm$ SEM, n = 6).

Von anderen Autoren wurden folgende Werte angegeben: 222-340 µg/ml (56), 399 µg/ml (65).

Rattenleber:

Leberstücke zwischen 20 und 50 mg einer durch Dekapitation getöteten Ratte wurden in flüssigem N_2 rasch eingefroren, auf der Analysenwaage gewogen und in 10 ml eiskalter 3 %iger MPA mit Ultraschall homogenisiert. Anschließend wurde bei $0^{\circ}C$ und 20 000 x g 1 h lang zentrifugiert. Ein Aliquot des Zentrifugenüberstandes wurde mit 15 % Na_3PO_4-Lösung neutralisiert und davon wurden 50 µl im vorne (s.S.41) beschriebenen Reaktionsansatz bestimmt.
Die gefundene Konzentration an Gesamtglutathion betrug 1,71 ± 0,3 mg/g Gewebe (Mittelwert ± SEM, n = 8).
Die in der Literatur angegebenen Werte schwanken zwischen 1,22 und 2,08 mg/g Gewebe (Tietze (56)) und 3,07 mg/g Gewege (65).
Die Untersuchungen zeigen, daß die von uns ausgearbeitete Mikromethode bei Anwendung auf Blut und Lebergewebe insbesondere mit der Originalliteratur von Tietze (56) und anderen Literaturangaben vergleichbare Werte liefert.

Im folgenden wurde versucht, diese Mikromethode auf Inselgewebe anzuwenden.

3.1.1.5 Anwendung der modifizierten Mikromethode auf Pankreasinseln

Dazu wurde mit vorinkubierten Inseln (Isolierung und Behandlung der Inseln siehe 3.2) wie unter 3.2.5 beschrieben verfahren. 40 µl des MPA-Zentrifugenüberstandes wurden mit 20 µl 15 % Na_3PO_4-Lösung zur Neutralisation versetzt und in dem unten beschriebenen Reaktionsansatz bestimmt.
Im Einzelnen sollten folgende Fragen geklärt werden:

1. Wie groß sind die methodischen Streuungen bei 2 Bestimmungen aus ein und demselben Inselhomogenat?
2. Wie hoch ist die Wiederfindungsrate von GSSG, das dem Inselhomogenat zugesetzt wurde?
3. Tritt ein Verlust an Gesamtglutathion beim Einfrieren (-30°C) auf?
4. Wird GSH im Verlaufe der Bestimmung zu GSSG oxidiert?

1. Doppelbestimmung von Gesamtglutathion

Vom Zentrifugenüberstand (erhalten nach 3.2.5) ein und desselben Inselhomogenats (10-20 Inseln/100 µl MPA) wurden 2 Bestimmungen durchgeführt. Es wurden je 40 µl des Überstandes neutralisiert und wie folgt in den Test eingesetzt.

Substanz	Volumen
Lösung 1: (Zusammensetzung s. 3.1.1.3.7)	400 µl
Probe	60 µl
Lösung 2: (Zusammensetzung s. 3.1.1.3.7)	20 µl
Endvolumen	480 µl

Die Durchführung erfolgte wie unter 3.1.1.3.7 beschrieben. Von 6 Inselhomogenaten wurden je 2 Bestimmungen a und b durchgeführt.

Probe	Gesamtglutation ng/60 µl a)	b)	Differenz ng
1	16,5	16,5	0
2	32	31,2	1,2
3	19	22,1	3,1
4	14,3	15	0,7
5	25,1	26,2	1,1
6	15,7	16,3	0,6

Tabelle 7: Doppelbestimmung von Gesamtglutathion aus ein und demselben Inselextrakt zur Feststellung der methodischen Streuung. Einzelheiten zum Bestimmungsansatz im Text.

Wie die Tab. 7 zeigt, liefern die Doppelbestimmungen gut über-
-einstimmende Werte, so daß später bei den unter 3.2. .4 beschriebenen Versuchen, da die biologische Streuung zwischen Inseln verschiedener Versuchstiere wesentlich höher ist, auf Doppelbestimmungen verzichtet wurde. Die Unterschiede im Gehalt der einzelnen Proben untereinander liegen an der Verwendung unterschiedlicher Anzahl von Inseln/Probe. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb anstelle von zwei Bestimmungen des Überstandes aus 40 µl die Gesamtglutathion-Bestimmung und aus weiteren 40 µl die GSSG-Bestimmung durchgeführt. (Siehe Seite 66)

2. Wiederfindungsrate für Glutathion in Inselgewebe (Recovery)

Um sicher zu gehen, daß mit unserem Test tatsächlich alles Glutathion erfaßt wird, und daß sich in dem zu untersuchenden Überstand aus Inselhomogenat keine die Bestimmung störenden Faktoren befinden, wurde eine Wiederfindung von Glutathion durchgeführt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

40 µl des Überstandes wurden mit 20 µl 3 % MPA, die 10 ng GSSG enthielt, versetzt. Weitere 40 µl des gleichen Überstandes wurden mit 20 µl 3 % MPA ohne GSSG versehen. Anschließend erfolgte Gesamtglutathionbestimmung wie oben beschrieben. Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde GSSG eingesetzt, weil GSH unter Bildung von gemischten Disulfiden der Form Protein-S-SG von Protein adsorbiert wird und dann vom Test nicht mehr erfaßt wird (vgl. Diskussion).

Probe Nr.	GSSG gefunden ohne GSSG-Zusatz ng/60 µl	GSSG gefunden mit GSSG-Zusatz ng/60 µl
1	18,0	25,0
2	17,5	25,8
3	13,2	22,0
4	37,6	46,8
5	25,2	37,6
6	22,3	29,4
7	19,8	31,5
8	19,0	23,3
9	11,9	17,2
10	14,2	26,4

Tabelle 8: Bestimmung der Wiederfindungsrate von GSSG (10 ng/60 µl), das dem Zentrifugenüberstand von Inselhomogenaten (10-20 Inseln/100 µl MPA) zugesetzt wurde. Die Bestimmung wurde wie unter 3.1.1.3.7 beschrieben ausgeführt.

Wie sich aus Tabelle 8 errechnet, wurden im Durchschnitt 8,7 ng des zugesetzten GSSG wiedergefunden.

3. Stabilität von Gesamtglutathion im Gewebehomogenat beim Einfrieren

Um zu untersuchen, ob ein Verlust an GSH-GSSG durch Aufbewahren in gefrorenem Zustand eintritt - eine solche Möglichkeit ist nicht ohne weiteres auszuschließen -, wurden 10-15 Inseln nach der Vorinkubation (siehe 3.2.3) in 100 µl MPA homogenisiert. Nach der Zentrifugation (siehe 3.2.5) wurde ein Teil des Überstandes direkt der GSH-Bestimmung unterworfen, der andere Teil wurde bei -30°C eingefroren und erst nach 7-10 Tagen bestimmt. Die Aufbewahrung erfolgte vor dem Neutralisationsschritt, also noch in stark saurem Milieu.

Probe Nr.	Gefunden bei sofortiger Bestimmung	Gefunden nach 7-10-tägiger Aufbewahrung bei -30°C
	Glutathion ng/40 µl	Glutathion ng/40 µl
1	16,5	16,5
2	33	34,7
3	37	29,4
4	18,5	15
5	28	27,3
6	19	19,7

Tabelle 9: Bestimmung von Gesamtglutathion bei sofortiger Ausführung der Bestimmung und nach 7-10-tägiger Aufbewahrung bei -30°C.

Wie die Tabelle 9 zeigt, scheint durch die Aufbewahrung kein Verlust an Gesamtglutathion aufzutreten.

4. Zusatz von GSH zum Zentrifugenüberstand von Inselhomogenaten

Weil GSH zu den leicht oxidierbaren Substanzen gehört, sollte untersucht werden, ob GSH im Verlaufe der Ausführung der Bestimmung teilweise zu GSSG oxidiert wird. Zur Klärung dieser Frage wurde GSH dem Zentrifugenüberstand zugesetzt und anschließend eine GSSG-Bestimmung durchgeführt. Als Kontrolle diente der Zentrifugenüberstand desselben Homogenates ohne GSH-Zusatz. Zu 40 µl des Überstandes vom Inselhomogenat (siehe 3.2.5) wurden 10 µl GSH-Lösung (10 ng GSH/ 10 µl 3 % MPA) gegeben. Zu weiteren 40 µl des gleichen Extraktes wurden 10 µl 3 % MPA ohne GSH zugegeben. Mit beiden Ansätzen wurde wie auf Seite 66 beschrieben die GSSG-Bestimmung ausgeführt.

Wie aus Tab. 10 hervorgeht, scheint während der Bestimmung geringfügig GSH oxidiert zu werden: ca. 0,9 ng des zugesetzten GSH wurden als GSSG erfaßt. GSH enthält als Verunreinigung etwa 1-3 % GSSG. Geht man von einem 3 %igen GSSG-Gehalt aus, wurden etwa 0,6 ng des zugesetzten GSH als GSSG erfaßt, was noch innerhalb der methodischen Streuung der Methode liegt.

Zu beachten ist allerdings, daß in vielen Geweben, in denen nur 3-4 % des Gesamtglutathions als GSSG vorliegen, schon ein kleiner Teil oxidierten GSH relativ große Fehler bei der GSSG-Bestimmung verursachen kann.

Probe Nr.	GSSG ng/40 µl Überstand	GSSG nach Zusatz von 10 ng GSH ng/40 µl Überstand	Differenz ng
1	14	17	+ 3
2	20	19,1	- 0,9
3	11,3	9,9	- 1,4
4	27,1	30,9	+ 3,8
5	18,1	19,3	+ 1,2
6	13	15,7	+ 2,7
7	19,8	17,9	- 1,9

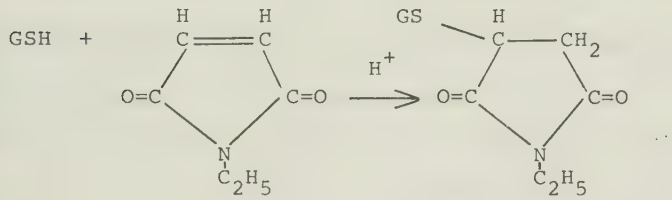
Tabelle 10: GSSG-Konzentration im Überstand von Inselhomogenaten mit und ohne Zusatz von 10 ng GSH/ 40 µl.

3.1.1.6 GSSG-Bestimmung nach Umsetzung mit NEM

Die vorliegende Methode der Gesamtbestimmung von Glutathion bietet die Möglichkeit, GSSG von GSH getrennt zu bestimmen. Wenn man GSH aus dem Medium entfernt, so bleibt nur die Bestimmung von GSSG. Aus der Differenz der Bestimmung von Gesamtglutathion und GSSG aus ein und derselben Probe kann dann GSH errechnet werden (56). Zur getrennten Bestimmung von GSH und GSSG kann GSH mit NEM umgesetzt werden, sodaß GSH im Testsystem nicht mehr erfaßt wird.

N-Äthylmaleinimid ist ein SH-Gruppen-Blocker, der mit GSH umgesetzt wird. GSH wird im Verlauf einer nucleophilen Additionsreaktion an die Doppelbindung des NEM addiert (66, 68).

Nucleophil: $G\text{-}S^{\ominus}$



Nach dieser Reaktion der Cystein SH-Gruppe des GSH kann letzteres im Test nicht mehr zu GSSG oxidiert werden. Dadurch wird die mit dem NEM entstandene Verbindung nicht mehr vom enzymatischen Test erfaßt und nur GSSG kann noch reagieren.

Damit die Beseitigung von GSH quantitativ abläuft, muß NEM im Überschuß zugegeben werden. Das nicht mit GSH umgesetzte NEM ist aber vollständig zu entfernen, weil bei der Cyclingreaktion ja notwendigerweise wieder GSH entsteht (siehe 3.1.1.1), das sofort mit NEM reagieren würde und so für den Test 'verloren' ginge. NEM kann durch mehrmaliges Extrahieren mit Äther, der mit einer Kapillare abgesaugt wird, entfernt werden. Die ebenfalls mögliche chromatografische Trennung über eine Säule ist wegen der Mikromengen, die beim Arbeiten mit Inseln erforderlich sind, nicht durchzuführen. Nach der Ätherextraktion muß der noch in der Lösung

verbliebene Äther durch Einleiten von Stickstoff oder durch Anlegen eines Unterdruckes entfernt werden, weil Äther die Glutathionreduktase hemmt (56).
Für die Anwendung eines solchen Vorgehens war es zumindest wichtig herauszufinden, wie groß der Überschuß an NEM sein muß, damit die Reaktion mit GSH quantitativ abläuft.

Die Konzentration von NEM muß auf jeden Fall größer sein, als die zu erwartende Konzentration an GSH, weil NEM auch mit anderen SH-Gruppen reagiert (Cystein, Protein-SH) und dadurch für die Umsetzung mit GSH verloren geht. Einen beliebig großen Überschuß an NEM einzusetzen, ist auch nicht sinnvoll, weil der Überschuß quantitativ extrahiert werden muß. Durch die unumgängliche Ätherextraktion, insbesondere bei Flüssigkeitsmengen von ca. 60 µl, wird Puffer und darin gelöstes Glutathion mit abgesaugt, außerdem löst Äther bis zu 1,5 % Wasser.
Die NEM-Konzentration muß also so gewählt werden, daß der Überschuß trotz erwünschter quantitativer Reaktion mit minimaler Ätherextraktion entfernt werden kann.
Tietze verwendete 0,04 M NEM für die GSSG-Bestimmung, allerdings wurde ein Vielfaches dessen an Gewebe eingesetzt, was vergleichsweise an Inselgewebe zur Verfügung steht.
Durch Variation der NEM-Konzentration sollte versucht werden, das für unsere Fragestellungen optimale molare Verhältnis des zu bestimmenden GSH zu der benötigten Menge an NEM zu finden.

Variation des molaren Verhältnisses GSH:NEM

Durch Veränderung des Verhältnisses GSH:NEM wurde versucht, eine konzentrationsabhängige Umsatzrate für die GSH-NEM Reaktion zu finden.

Zu diesem Zweck wurden Lösungen von GSH mit verschiedenen Konzentrationen an NEM umgesetzt und eine Gesamtglutathionbestimmung durchgeführt, bei der die gemessene Menge "Gesamtglutathion" der nicht von NEM umgesetzten GSH-Menge entsprach.

Dazu diente folgender Ansatz:

GSH	NEM	NEM	Molares Verhältnis GSH:NEM	
ng/500 µl	2,0 mM	0,2 mM	für NEM 2,0mM	für NEM 0,2mM
50	2,0 mM	0,2 mM	1:1250	1:125
100	2,0 mM	0,2 mM	1:625	1:62,5
200	2,0 mM	0,2 mM	1:307	1:30,7

Endvolumen 500 µl

Durchführung:

Die GSH-Lösungen wurden bei Zimmertemperatur eine Stunde lang mit NEM stehen gelassen. Dann wurde 10 mal mit 0,5 ml Äther extrahiert und in einem evakuierten Exsiccator die letzten Ätherspuren entfernt, anschließend wurden von jedem Ansatz 50 µl entnommen und wie unter 3.1.1.2 (s. Seite 17) beschreiben die GSSG-Bestimmung ausgeführt.

Wie die Abb. 10 zeigt, scheint die Reaktion schon mit einem 30-fachen Überschuß an NEM (0,2 mM) quantitativ abzulaufen, denn die bei einem 1250-fachen Überschuß von NEM

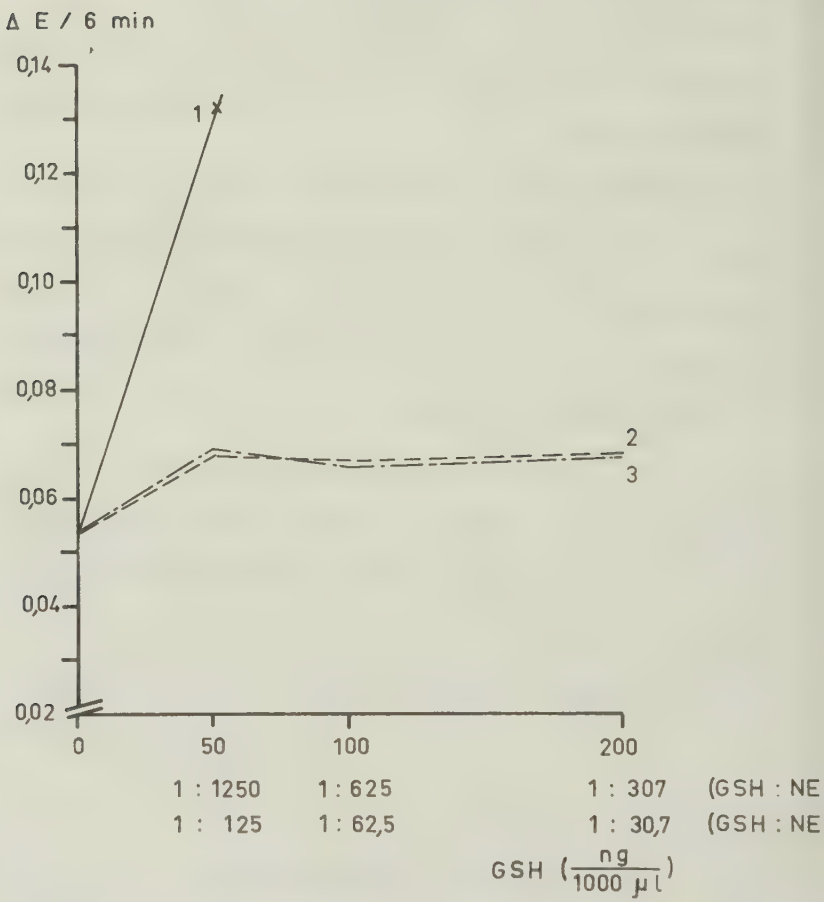


Abb. 10: Abhängigkeit der Umsetzung zwischen GSH und NEM vom molaren Verhältnis GSH:NEM und Vergleich der erhaltenen Extinktionen mit GSH-Standard ohne vorherige Umsetzung mit NEM
1) GSH-Standard ohne NEM
2) NEM 2 mM, ergab GSH:NEM 1:1250, 1:625, 1:312
3) NEM 0,2 mM, ergab GSH/NEM 1:125, 1:62,5, 1:31,7
Einzelheiten zum Reaktionsansatz finden sich im Text.

erhaltenen Extinktionen liegen nicht unter denen, die bei 30-fachem NEM-Überschuß erhalten wurden.
Für die Versuche mit Pankreasinseln wurde NEM in der Konzentration von 10 mmol/l eingesetzt, weil nicht bekannt war, wieviel SH-Gruppen, die nicht vom GSH stammen, wie z.B. Protein-SH und Cystein, aber auch mit NEM reagieren, im Homogenat von Pankreasinseln enthalten sind.
In Abb. 10 fällt auf, daß es trotz Überschuß an NEM noch zu einer, wenn auch geringen, Extinktionszunahme kommt. Vom Hersteller wurde angegeben, daß das für die Versuche von Abb. 10 verwendete GSH mit geringen Mengen GSSG verunreinigt ist. In den Versuchen zu Abb. 10 wird GSH mit Hilfe von NEM umgesetzt und wird bei der anschließenden Cyclingreaktion nicht erfaßt (siehe 3.1.1.1). Wenn es dennoch zu einer geringen Extinktionszunahme gekommen ist, so kann dies dafür sprechen, daß etwas GSSG vorhanden war, das am Cyclingtest teilnimmt. Da aufgrund dieser Ergebnisse nicht auszuschließen war, daß der von uns zur Erstellung der Eichkurve verwendete GSH-Standard geringe GSSG-Mengen enthielt, die, da bei unserem Test Gesamtglutathion bestimmt wird, mit in eine GSH-Bestimmung eingehen würden, wurde diese Frage im nächsten Ansatz mit Hilfe von NEM zu klären versucht.
Um zu klären, ob die Extinktionszunahme auf verunreinigendes GSSG zurückzuführen war, wurde jetzt die Extinktionszunahme bei einer gleichbleibenden und ausreichenden NEM-Konzentration (40 mM), aber steigender GSH-Konzentration untersucht. Dazu diente folgender Ansatz:

Substanz	Volumen	Endkonzentration
GSH in Phosphat-puffer pH 7,1 0-20000 ng/50 µl	50 µl	0, 500, 2000, 5000, 10000, 20000 ng/70 µl
NEM in Phosphat-puffer pH 7,1 40 mM	20 µl	11,4 mM

Nach einstündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurde die Extraktion des NEM, wie auf Seite 54 beschrieben, ausgeführt und die Proben in den Test (siehe 3.1.1.2) eingesetzt.

Wie die Abb. 11 zeigt, nimmt die Extinktion in Abhängigkeit von der eingesetzten GSH-Konzentration zu. Die für 23000 ng/ml GSH nach NEM-Umsetzung erhaltene Extinktion entspricht derjenigen, die für 500 ng/ml GSH erhalten wurde, das ohne vorherige NEM-Umsetzung in den Test eingesetzt wurde. Daraus berechnete sich ein GSSG-Gehalt des GSH von 2-3 %. Vom Hersteller wird ein GSSG-Gehalt von 1-2 % angegeben.

Abhängigkeit der GSH-NEM Reaktion vom pH-Wert

Das Neutralisieren des 3 % MPA-Gewebsextraktes mit 15 % Na_3PO_4-Lösung (siehe S. 44) stellt insofern einen gewissen Unsicherheitsfaktor dar, weil an der Stelle, an der die Na_3PO_4-Lösung zugemischt wird, eine hohe Alkalikonzentration zu erwarten ist, bei der die Oxidation von GSH zu GSSG begünstigt würde. Das Lösen von NEM in stark saurem oder alkalischem Milieu ist nicht möglich, weil NEM nicht stabil ist (69,70). Folgende Möglichkeit bot sich an: Eine

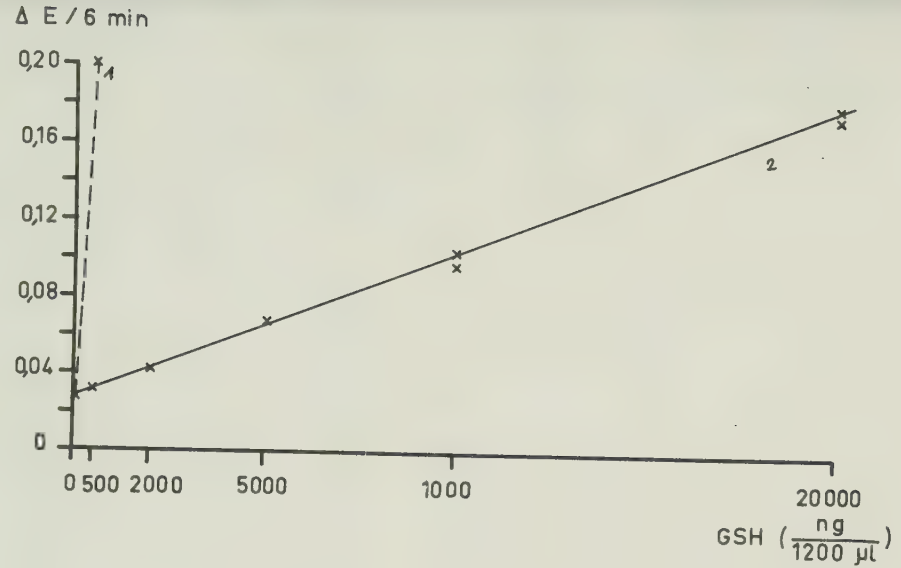


Abb. 11: Abhängigkeit der Extinktionszunahme/6 min vom GSSG-Anteil, der in einer GSH-Standardlösung (0 - 20000 ng/1200 µl) enthalten war, nach Umsetzung mit 0,04 M NEM.
1) GSH 0-500 ng/1200 µl ohne Umsetzung mit NEM
2) GSH 0-20000 ng/1200 µl nach vorheriger Umsetzung mit NEM.

dem Gewebsextrakt entsprechende MPA-Lösung mit soviel Na_3PO_4 zu versetzen, daß sich ein schwach saurer pH-Wert einstellt, bei dem GSH noch stabil ist, die Reaktion mit NEM aber schon abläuft. Erst anschließend wird dann der Rest der Na_3PO_4-Lösung dazugegeben, um pH 7,1 einzustellen. Dazu mußte die pH-Abhängigkeit der Reaktion zwischen GSH-NEM untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der zeitliche Verlauf der Reaktion bei pH 4, pH 5,5 und pH 7,1 durch spektralphotometrische Messung verfolgt und aufgezeichnet. Das Extinktionsmaximum von NEM liegt bei 302 nm (69). Das entstehende Reaktionsprodukt absorbiert nicht bei dieser Wellenlänge, deshalb läßt sich aus der Extinktionsabnahme der Reaktionsverlauf ableiten.

In der 3,0 ml-Küvette befand sich GSH 2 mM 1,0 ml
NEM 2 mM 1,0 ml.

Wie die Abb. 12 zeigt, ist die Reaktionsgeschwindigkeit bei pH 4 zu gering, zwischen pH 5 und 6 annähernd groß genug. Deshalb wurde für die weiteren GSSG-Bestimmungen durch Zugabe von 10 µl Na_3PO_4 zu 40 µl MPA-Extrakt (siehe 3.2.5) ein pH-Wert zwischen 5 und 6 eingestellt, bei dem die Oxidation von GSH gering ist und eine rasche Umsetzung mit NEM erfolgt. Erst dann wurde durch Zugabe von weiteren 10 µl Na_3PO_4-Lösung vollständig neutralisiert.

Bestimmung von GSH neben GSSG

Da im Gewebe allgemein ein Überschuß von GSH gegenüber GSSG beobachtet wird (65), war nun zu prüfen, ob unsere Methode, soweit sie bisher entwickelt wurde, empfindlich

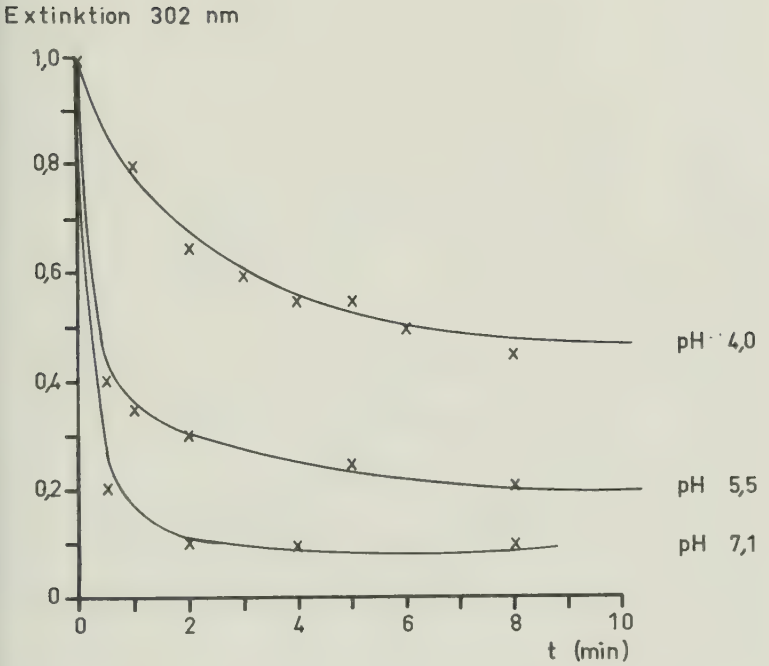


Abb. 12: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen GSH und NEM vom pH-Wert des Reaktionsmediums.
Konzentrationen GSH: 1 mM, NEM: 1 mM
1) Puffer pH 4,0
2) Puffer pH 5,5
3) Puffer pH 7,1
Gemessen wurde die Extinktionsabnahme bei 302 nm

genug ist, bei einem Verhältnis GSH:GSSG wie 10:1 GSSG exakt zu erfassen.

Von einer Lösung, die GSH:GSSG im Verhältnis 10:1 in Puffer (0,1 M Phosphat/0,005 M EDTA) enthielt, wurde eine Verdünnungsreihe, die GSH zwischen 0 und 20 ng/50 µl und gleichzeitig GSSG zwischen 0 und 2 ng/50 µl enthielt, hergestellt. Zum Beispiel waren in einem Ansatz 10 ng GSH und 1 ng GSSG, zusammen also 11 ng Gesamtglutathion enthalten.

Zur Gesamtglutathionbestimmung wurden von obigen Lösungen 50 µl entnommen und direkt in den Test (s.S. 44) eingesetzt. Zur GSSG-Bestimmung wurden ebenfalls 50 µl entnommen, mit 20 µl NEM (0,04 M) 1 h stehengelassen und nach der Extraktion des nicht umgesetzten NEM mit Äther (s.S. 53) zum Entfernen der letzten Ätherspuren 1 h lang im evakuierten Exsiccator aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben in den Test (s.S. 44) eingesetzt und die Cycling-Reaktion durchgeführt.

Abb. 13 zeigt, daß die GSSG-Kurve, die aus den Werten der GSSG-Bestimmung mit Hilfe einer Regression errechnet wurde, erwartungsgemäß deutlich unter der Gesamtglutathion-Kurve liegt.

Wie aus Tab. 11 hervorgeht, bei der die gefundenen Mengen an GSSG den eingesetzten gegenübergestellt wurde, beträgt die Differenz zwischen den tatsächlich eingesetzten und den aus der Bestimmung errechneten Werten bei 11 ng Gesamtglutathion, was einem GSH:GSSG Verhältnis von 10:1 entspricht, ca. 0,12 ng. Man kann also ab 11 ng Gesamtglutathion 1 ng GSSG mit einem Fehler von 12 % neben 10 ng GSH in derselben Lösung nachweisen.

ng/50 µl			8 E/20 min		mit Hilfe einer Regressionsfunktion berechnete Werte ng/50 µl	
GSH	GSSG	GSH + GSSG	GSH + GSSG	GSSG	GSH	GSSG
0	0	0	0,262	0,262	0,07	0,07
1,25	0,125	1,375	0,32	0,297	0,823	0,20
2,5	0,25	2,75	0,432	0,311	2,71	0,37
3,75	0,375	4,125	0,494	0,317	3,75	0,44
5,0	0,5	5,5	0,58	0,328	5,20	0,57
7,5	0,75	8,25	0,756	0,359	8,17	0,94
10,0	1,0	11,0	0,865	0,374	10,0	1,12
15,0	1,5	16,5	1,156	0,407	14,91	1,51
20,0	2,0	22,0	1,44	0,429	19,70	1,77

Tabelle 11: Bestimmung von GSH und GSSG aus einer Lösung, die GSH:GSSG wie 10:1 zwischen 0-20 ng GSH/50 µl bzw. 0-2 ng GSSG/50 µl eingesetzter Lösung enthält. Die Berechnung der GSSG-Werte erfolgte mit einer Regression siehe Seite 103.

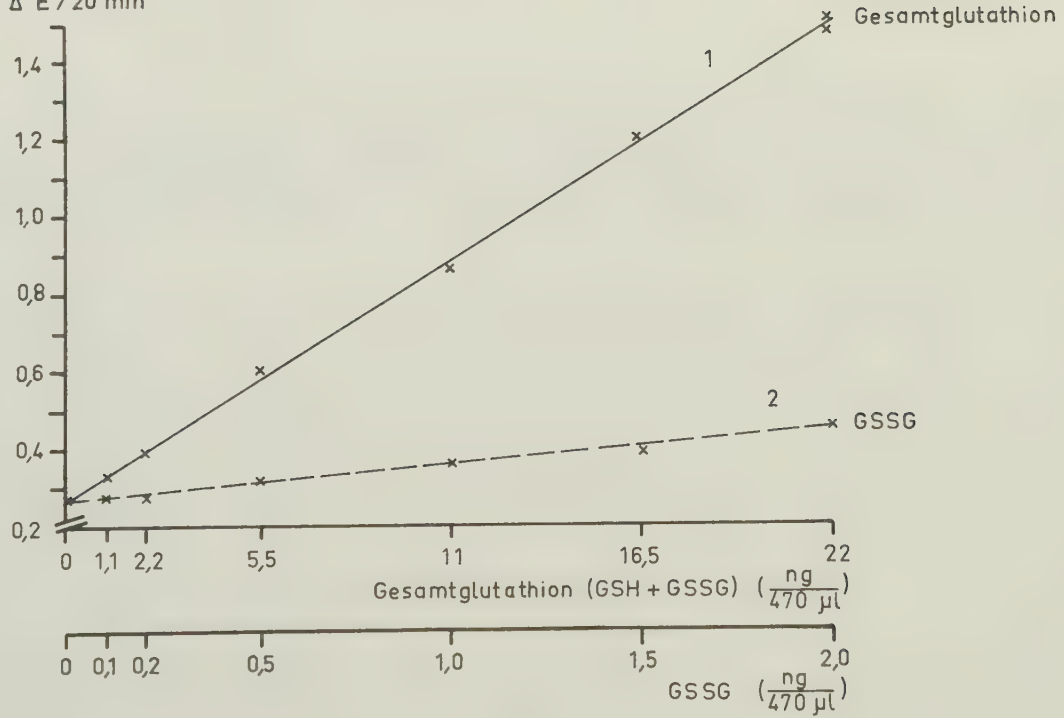


Abb. 13: Bestimmung von GSSG aus einer Mischung von GSH und GSSG im Verhältnis 10:1, zwischen 0 und 20 ng/470 µl GSH bzw. 0 und 2 ng/470 µl GSSG.
1) Bestimmung von GSH + GSSG (ohne NEM-Umsetzung)
2) Bestimmung von GSSG nach NEM-Umsetzung
Reaktionsansatz siehe Text.

3.1.1.7 Vorschrift zur Bestimmung von GSH neben GSSG in Pankreasinseln

Nachdem gezeigt werden konnte, daß GSSG auch bei einem so großen Überschuß von GSH, wie er in den meisten bisher untersuchten Geweben gefunden wurde (65), hinreichend genau meßbar ist, konnte die GSSG-Bestimmung auf Pankreasinseln angewendet werden.

Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

Zur Gesamtglutathion-Bestimmung wurden 40 µl Zentrifugenüberstand aus Inselhomogenat (siehe 3.2.5) in ein Polyäthylenreaktionsgefäß (2,0 ml) überführt, mit 20 µl 15 % Na_3PO_4-Lösung neutralisiert und in den Test (s.S. 40) eingesetzt.

Zur GSSG-Bestimmung wurden weitere 40 µl ein und desselben Zentrifugenüberstandes in ein Reaktionsgefäß, das bereits 10 µl 15 % Na_3PO_4-Lösung enthielt, überführt. Anschließend wurden 20 µl NEM (0,04 M) zupipettiert, mit weiteren 10 µl Na_3PO_4-Lösung vollständig neutralisiert und mit dem Whirlmix sorgfältig gemischt. Nach einstündiger Reaktion bei Zimmertemperatur wurde das überschüssige NEM 10 mal mit je 200 µl wassergesättigtem Äther extrahiert. Um letzte Ätherspuren zu beseitigen, wurden die Proben 1 h im evakuierten Exsiccator stehengelassen. Anschließend wurde wie unter 3.1.1.3.7 auf Seite 40 beschrieben die Cycling-Reaktion ausgeführt.

Zur Erstellung der GSSG-Eichkurve wurde eine GSSG-Verdünnungsreihe (GSSG-Standard) in 3 % MPA hergestellt, die GSSG zwischen 0 und 20 ng/40 µl enthielt.

Von diesen Standardlösungen wurden 40 µl genau wie die Probenlösungen mit unbekanntem Gehalt behandelt.
Der GSH-Gehalt der Proben errechnete sich aus der Differenz zwischen Gesamtglutathion und GSSG.

3.1.2 Fluorimetrische Glutathion-Bestimmung mit Orthophthaldialdehyd (OPT)

Obwohl bisher gezeigt werden konnte, daß mit Hilfe der von uns modifizierten Methode nach Tietze GSH und GSSG in genügend großer Genauigkeit im Inselgewebe bestimmt werden kann, ergeben sich doch Probleme, die nicht befriedigend zu lösen sind:

1. Ist der zeitliche Aufwand für die Ätherextraktion von NEM groß.
2. Entsteht mit der Ausätherung eine Ungenauigkeit hinsichtlich des im ausgeschüttelten Volumen verbleibenden GSSG.
3. Können fehlerhafte GSH-Werte dann erwartet werden, wenn aus irgendeinem technischen Grund eine fehlerhafte GSSG-Bestimmung durchgeführt wurde (GSH wird wie oben beschrieben berechnet aus Gesamtglutathion minus GSSG).
4. Die Methode ist wegen der hohen Kosten an Glutathionreduktase relativ teuer.
5. Thiolreagenzien, die als "tools" verwendet werden, stören die Bestimmung.

Es war daher notwendig, eine weitere Methode zur Bestimmung von GSSG und GSH so zu modifizieren, daß sie auf die Bestimmung geringer Mengen an zur Verfügung stehendem Inselgewebe anwendbar ist.
Es wurde daher die fluorimetrische Methode von Hissin modifiziert und anschließend ihre Brauchbarkeit bzw. ihr Vorteil im Vergleich zur modifizierten Methode von Tietze geprüft.

3.1.2.1 Beschreibung der Methode

Von Cohn und Lyle wurde 1966 erstmals eine GSH-Bestimmung mit OPT beschrieben (59). Nach ihrer Arbeitsvorschrift konnte GSH in den Konzentrationen zwischen 0 µg bis 10 µg GSH/ml bestimmt werden. GSSG wurde in diesem Reaktionsansatz nicht erfaßt. Hissin und Hilf griffen 1976 diese Methode wieder auf und zeigten, daß nach Umsetzung von GSH mit NEM auch GSSG bestimmt werden kann (60).

Bestimmung von GSH

GSH bildet mit OPT bei pH 8 einen stark fluoreszierenden Komplex, der fluorimetrisch quantitativ bestimmt werden kann. Die Messung erfolgt bei 420 nm Wellenlänge (Emission),nach Anregung bei 350 nm. Bei pH 8,0 ist die Reaktion spezifisch für GSH. Eine durch GSSG, Cystein, Cystin, Leucin, Glutaminsäure, Glycin ausgelöste Fluoreszenz beträgt max. 1 % der durch GSH verursachten und ist somit

unerheblich. Die Fluoreszenz ist stark pH-abhängig. Unterhalb von pH 8 nimmt sie deutlich ab (60).

GSSG-Bestimmung

Die GSSG-Bestimmung erfolgt bei pH 12,0 und ist hier für GSSG spezifisch: Glutaminsäure, Cystein, Cystin, Leucin, Glycin stören weniger als 0,6 %. GSH kann daher durch NEM eliminiert werden, wodurch eine Oxidation zu GSSG im alkalischen Milieu zu verhindern ist.

3.1.2.2 Durchführung der GSH- und GSSG-Bestimmung nach Hissin (60)

Lösungen für die OPT-Methode

Für die weiteren Untersuchungen wurden folgende, bisher noch nicht beschriebene Lösungen verwendet:

Puffer: 0,1 M Na-Phosphat/0,005 M EDTA pH 8,0

NEM : 2 mM in Puffer (0,1 M Phosphat/0,005 M EDTA pH 8,0)

OPT : 1 mg/ml in Methanol zur Szintillationsmessung

Die Lösungen von NEM und OPT wurden jeden Tag frisch angesetzt.

Sofern nicht anders erwähnt, wurde für alle anderen Lösungen oben beschriebener Phosphatpuffer verwendet.

Die GSH- und GSSG-Standardlösungen wurden in 3 % MPA, die mit 15 % Na_3PO_4-Lösung neutralisiert war, hergestellt, wenn nichts anderes angegeben ist.

Das Gewebe (z.B. Leber) wird wie folgt aufbereitet:
250 mg Gewebe werden in 1,0 ml 25 % MPA und 3,75 ml Phosphat-Puffer homogenisiert und anschließend 30 min bei 100 000 x g und 4°C zentrifugiert.
Zur GSH-Bestimmung werden 0,5 ml des Überstandes mit 4,5 ml Phosphat-Puffer pH 8 verdünnt. Davon werden 100 µl mit 1,8 ml Phosphat-Puffer pH 8 und 100 µl OPT-Lösung (1 mg/ml in Methanol) versetzt. Nach 15-minütigem Stehen bei Zimmertemperatur wird die Fluoreszenz gemessen.
Zur Ausführung der GSSG-Bestimmung werden 0,5 ml des Zentrifugenüberstandes mit 200 µl NEM (0,04 M) 20-30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Dadurch wird GSH mit NEM umgesetzt und kann danach nicht mehr oxidiert werden und wird deshalb im Test nicht mehr erfaßt. Anschließend wird mit 4,3 ml NaOH (0,1 N) verdünnt. 100 µl dieser Lösung werden mit 1,8 ml NaOH (0,1 N) und 100 µl OPT-Lösung (1 mg/ml) versetzt. Nach genau 15 min wird die Fluoreszenz gemessen.

Diese Vorschrift wird von den Autoren für die Bestimmung in Konzentrationen zwischen 0,1 und 2 µg/ml bzw. als niederst mögliche Konzentration 10 ng/2 ml - 100 ng/2 ml angegeben. Eine Überprüfung der Originalmethode von Hissin (siehe Abb. 14) ergab eine lineare Abhängigkeit der Fluoreszenz von der GSH-Konzentration zwischen 0-100 ng/ml, ähnlich wie dies von Hissin beschrieben wurde.
Um die Empfindlichkeit für unsere Bedürfnisse (10-50 µg Gewebe/Ansatz) zu erhöhen, wurde zunächst geprüft, ob die Reaktion auch in kleinerem Volumen mit genügender Genauig-

keit abläuft. Es wurde daher die Fluoreszenz von umgesetztem GSH und GSSG in Ansätzen folgender Zusammensetzung bestimmt:

Substanz	Ansatz zur GSH-Bestimmung Volumen	Ansatz zur GSSG-Bestimmung Volumen
GSH (0-10 ng/50 µl)	50 µl	-
GSSG (0-10 ng/50 µl)	-	50 µl
NEM 0,04 M	-	20 µl
Puffer (s.S. 69)	500 µl	-
0,1 N NaOH	-	500 µl
OPT (1 mg/ml)	50 µl	50 µl

Nach 15 min erfolgte die Messung der Fluoreszenz bei 420 nm (Emission) nach Anregung bei 350 nm. Im Gegensatz zur enzymatischen Methode kann NEM im Testansatz für GSSG anwesend sein, ohne zu stören.

Wie die Abb. 15 und 16 zeigen, ist die Fluoreszenz auch bei so niederen Konzentrationen wie zwischen 0 und 10 ng/500 µl GSH und GSSG linear von deren Konzentration abhängig. Durch Ausführung der Bestimmung im Mikroansatz kann also die Empfindlichkeit des Meßbereichs auf 1-10 ng GSH bzw. GSSG/Ansatz gesenkt werden, wie es für die Glutathionbestimmung in Pankreasinseln erforderlich ist. Dies liegt daran, daß die Anwendung der Fluorimetrie gegenüber der Absorptionsphotometrie eine echte Steigerung der Testempfindlichkeit um max. den Faktor 1000 bedeutet (71).

Da es für unsere Fragestellung außerordentlich wichtig war, exakt GSH neben GSSG zu erfassen, wurden folgende Untersuchungen ausgeführt:

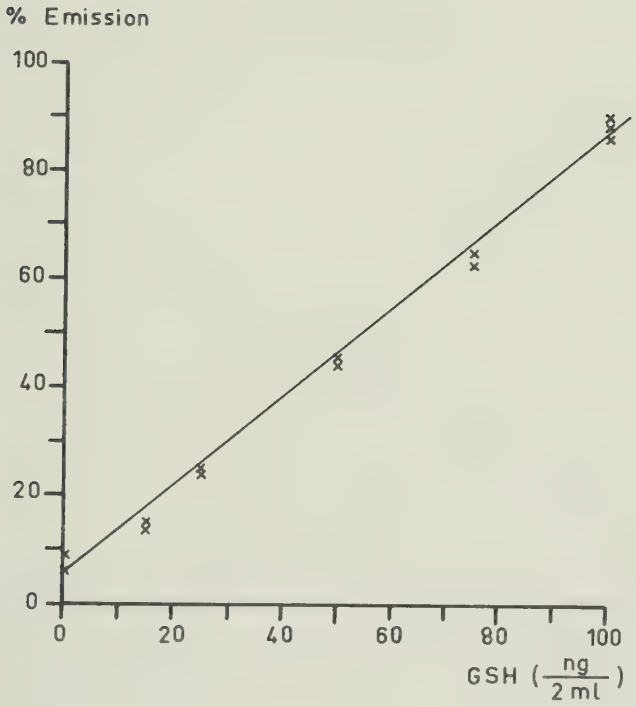


Abb. 14: Abhängigkeit der GSH-OPT Fluoreszenz von der GSH-Konzentration zwischen 0 und 100 ng/2 ml nach der Originalvorschrift von Hissin (vgl. 3.1.2.2).

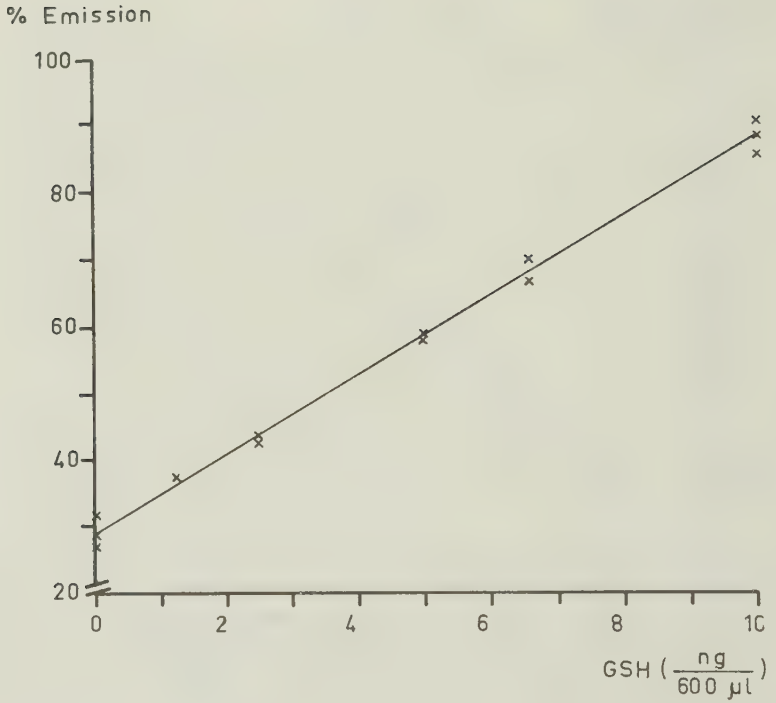


Abb. 15: Abhängigkeit der GSH-OPT-Fluoreszenz von der GSH-Konzentration zwischen 0 und 10 ng/600 µl nach der unter 3.1.2.5 beschriebenen modifizierten Methode.

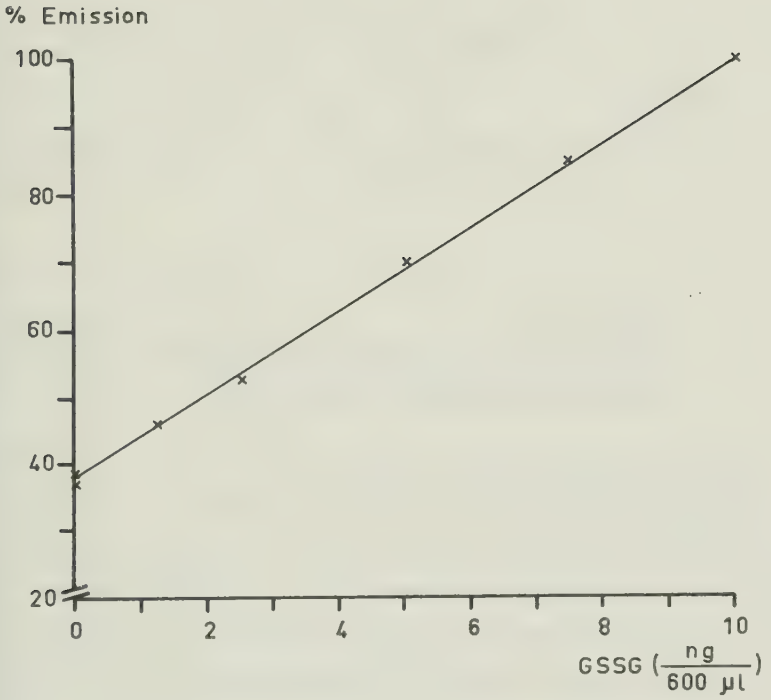


Abb. 16: Abhängigkeit der GSSG-OPT-Fluoreszenz von der GSSG-Konzentration zwischen 0 und 10 ng/600 µl nach der unter 3.1.2.5 beschriebenen modifizierten Methode.

1. Einfluß von GSSG auf die GSH-Bestimmung.
2. Einfluß von NEM auf die Fluoreszenzbildung bei der GSSG-Bestimmung.
3. Einfluß von GSH auf die GSSG-Bestimmung.
4. Einfluß der OPT-Konzentration auf die Fluoreszenzbildung.
5. Einfluß der Alkaliionenkonzentration auf die Fluoreszenz.

3.1.2.3 Untersuchungen zur Spezifität der modifizierten OPT-Methode gegenüber GSH bzw. GSSG

1. Einfluß von GSSG auf die GSH-Bestimmung

Zur Klärung der Frage, ob GSSG die GSH-Bestimmung bei pH 8,0 der von uns modifizierten Methode beeinflußt, wurde aus einer GSH-GSSG-Mischung die GSH-Bestimmung durchgeführt. Dazu wurden folgende Lösungen hergestellt:

1: GSH-Standard 0-20 ng/50 µl Phosphatpuffer (s.S. 69
2: wie Lösung 1, jedoch zusätzlich GSSG 20 ng/50 µl

Die Standardlösungsreihe 2 enthielt also 0-20 ng GSH und konstant GSSG 20 ng/50 µl. Damit konnte auch festgestellt werden, ob und in welchem Überschuß GSSG die GSH-Bestimmung beeinflußt. Mit folgendem Ansatz wurde die GSH-Bestimmung durchgeführt:

Substanz	Volumen	
	Ansatz 1	Ansatz 2
Puffer (0,1 M Phosphat/ 0,005 M EDTA)	500 µl	500 µl
Lösung 1 (nur GSH)	50 µl	-
Lösung 2 (GSH+GSSG)	-	50 µl
OPT (1 mg/ml)	50 µl	50 µl

15 min nach Zugabe des OPT-Reagens wurde die Fluoreszenz gemessen. Wie die Abb. 17 zeigt, beeinflußt GSSG die GSH-Bestimmung geringfügig nur dann, wenn GSSG in sehr großem Überschuß vorliegt. Meßpunkt 0 enthält z.B. kein GSH aber 20 ng/600 µl GSSG.

Um weiterhin festzustellen, ob GSSG im Verlaufe der GSH-Bestimmung bei pH 8,0 mit der von uns modifizierten Methode tatsächlich, wie von Hissin berichtet, nicht ebenfalls mit erfaßt wird, wurde die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der GSH-Konzentration gemessen und mit der von GSSG verglichen. Dazu wurden Standardlösungen in Phosphat-Puffer hergestellt:

1. GSH 0-100 ng/50 µl
2. GSSG 0-100 ng/50 µl

und deren Fluoreszenz nach folgendem Ansatz bestimmt:

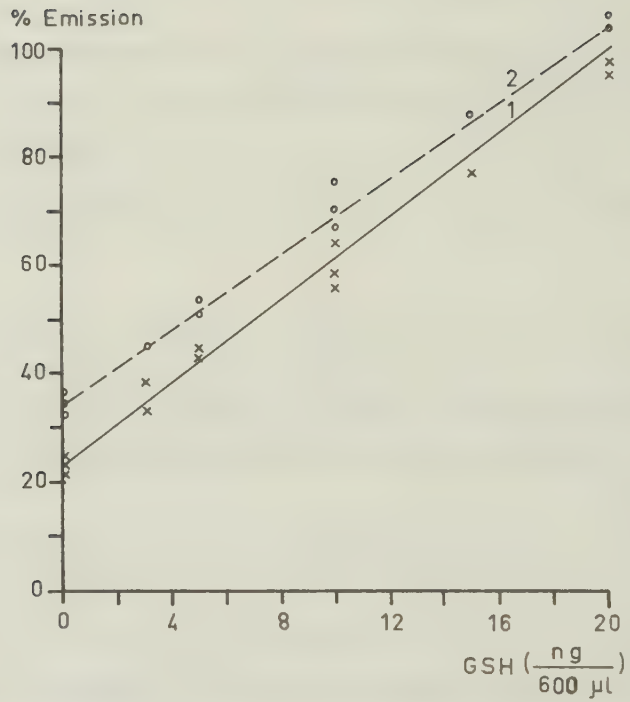


Abb. 17: Abhängigkeit der OPT-Fluoreszenz von GSH und GSSG bei Durchführung der GSH-Bestimmung nach 3.1.2.5 aus Mischungen von GSH und GSSG.
1) Abhängigkeit der Fluoreszenz von der GSH-Konzentration zwischen 0 und 20 ng/600 µl
2) Abhängigkeit der Fluoreszenz von der GSH-Konzentration zwischen 0 und 20 ng/600 µl bei gleichzeitiger Anwesenheit von GSSG 20 ng/ 600 µl.

Substanz	Volumen	
	Ansatz 1	Ansatz 2
Puffer (0,1 M Phosphat/ 0,005 M EDTA) pH 8,0	1,0 ml	1,0 ml
GSH (0-100 ng/50 µl)	50 µl	0
GSSG (0-100 ng/50 µl)	0	50 µl
OPT (1 mg/ml)	50 µl	50 µl

Nach 15 min wurden folgende Fluoreszenzen (% Emission) erhalten:

GSH bzw. GSSG ng/1100 µl	GSH-Fluoreszenz % Emission	GSSG-Fluoreszenz % Emission
0	0,1	0,1
6,125	6,4	0,5
12,5	11,5	0,6
25	25,8	0,5
50	51	2,4
75	76	1,4
100	102	0,5

Tabelle 12: Abhängigkeit der Fluoreszenz von GSH und GSSG bei Durchführung der GSH-Bestimmung nach 3.1.2.
Ansatz 1: Erhaltene Fluoreszenzen für GSH (bei 0-100 ng/1100 µl) in % Emission
Ansatz 2: Erhaltene Fluoreszenzen für GSSG (bei 0-100 ng/1100 µl) in % Emission

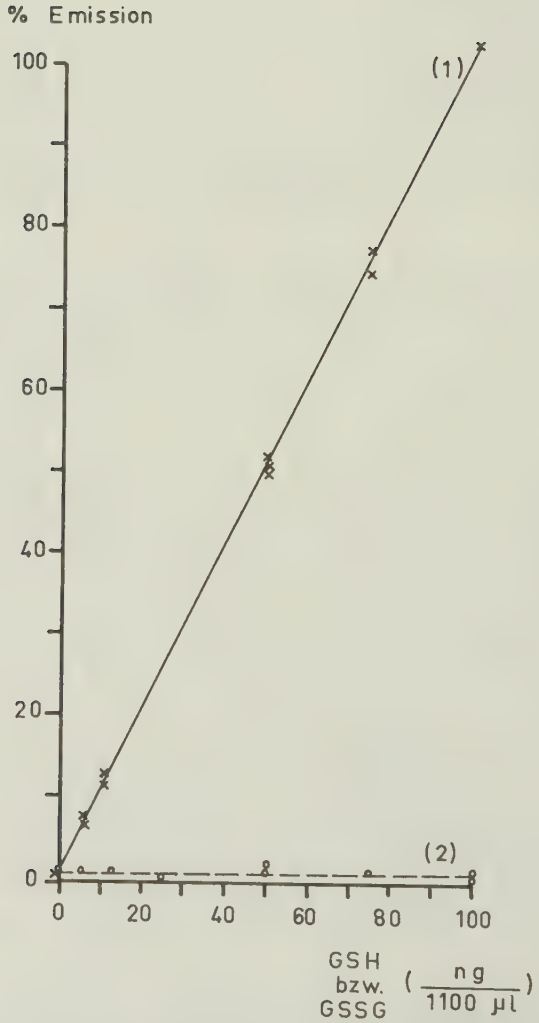


Abb. 18: Abhängigkeit der OPT-Fluoreszenz von GSH und GSSG bei Durchführung der GSH-Bestimmung nach 3.1.2.5
1) GSH-Standard (0-100 ng/1100 µl)
2) GSSG-Standard (0-100 ng/1100 µl)

Wie aus Tab. 12 und Abb. 18 hervorgeht, wird GSSG bei der GSH-Bestimmung praktisch nicht erfaßt. Die für GSSG erhaltene Fluoreszenz beträgt max. 1 % der durch GSH verursachten.

2. Einfluß von NEM auf GSSG-Bestimmung

Bei der von uns modifizierten Methode nach Tietze (56) mußte NEM vor dem Cyclingprozeß entfernt werden. Obwohl von Hissin mitgeteilt wurde, daß dies bei der von ihm angegebenen Methode nicht erforderlich ist, sollte dennoch geprüft werden, ob NEM den Test auch im Mikroansatz nicht stört.

Dazu wurde wie folgt vorgegangen:

Von Standardlösungen mit Konzentrationen von 0-100 ng GSSG/ 50 µl in Phosphat-Puffer wurden je 50 µl jeder Standard-Konzentration mit NEM umgesetzt und je 50 µl direkt in die GSSG-Bestimmung eingesetzt:

Substanz	Volumen	
	1. Ansatz	2. Ansatz
GSSG (0-100 ng/50 µl)	50 µl	50 µl
NEM (0,04 M in Phosphat-Puffer)	-	20 µl
Puffer (0,1 M Phosphat/ 0,005 M EDTA) pH 8,0	20 µl	-

Nach 30 min Stehenlassen wurde die GSSG-Bestimmung wie auf Seite 71 beschrieben durchgeführt.

Wie die Abb. 19 zeigt, erfolgt durch NEM, das sich im Testansatz befindet, keine Beeinflussung der durch den GSSG-OPT-Komplex ausgelösten Fluoreszenz. NEM muß also nicht, wie es bei der Cycling-Methode (siehe 3.1.1.6) erforderlich war, durch Ausäthern entfernt werden.

3. Einfluß von GSH auf die GSSG-Bestimmung

Nachdem gezeigt worden war, daß einerseits bei der GSH-Bestimmung GSSG nicht erfaßt wird, sollte andererseits noch geklärt werden, ob GSH die GSSG-Bestimmung beeinflußt. Dazu wurden wieder 2 Standardverdünnungsreihen hergestellt.

Verdünnungsreihe 1: GSSG-Standard 0-20 ng GSSG/50 µl
Phosphat-Puffer (siehe S.69)

Verdünnungsreihe 2: wie 1. aber zusätzlich 20 ng GSH/50 µl

Mit beiden Verdünnungsreihen wurde jetzt die GSSG-Bestimmung durchgeführt. Nach 30 min Stehenlassen mit 0,04 M NEM bei Zimmertemperatur wurde nach folgendem Ansatz verfahren:

Lösungen	Volumen	
	Ansatz 1	Ansatz 2
0,1 N NaOH	500 µl	500 µl
Standard 1 (GSSG)	50 µl	0
Standard 2 (GSSG+GSH)	0	50 µl
OPT (1 mg/ml)	50 µl	50 µl

Nach 15 min wurde die Fluoreszenz gemessen.

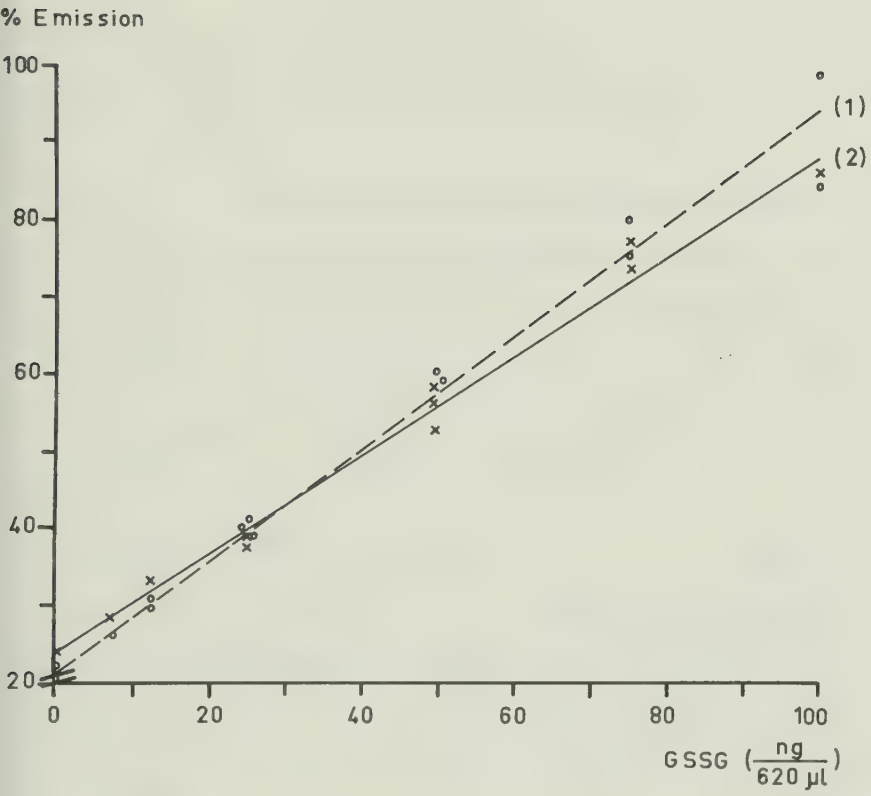


Abb. 19: Abhängigkeit der GSSG-OPT-Fluoreszenz von der GSSG-Konzentration mit und ohne vorherige Umsetzung mit 0,04 M NEM.
1) GSSG (0-100 ng/620 µl) ohne vorherige Umsetzung mit NEM
2) GSSG (0-100 ng/620 µl) nach Umsetzung mit NEM.

Wie die Abb. 20 zeigt, beeinflußt GSH die GSSG-Bestimmung nur, wenn GSH in großem Überschuß vorliegt, Meßpunkt O enthält O GSSG aber 20 ng GSH, diese erhaltene Fluoreszenz könnte durch die geringe im GSH enthaltene GSSG-Verunreinigung verursacht sein (vergleiche Cycling-Methode 3.1.1.6).

4. Variation der OPT-Reagenskonzentrationen

Durch Veränderung der OPT-Konzentration wurde versucht, die Empfindlichkeit der Methode weiter zu steigern. Es wurde daher die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der OPT-Konzentration untersucht. Dazu wurden verschiedene OPT-Konzentrationen im Ansatz wie folgt variiert:

Substanz	Volumen
Puffer (0,1 M Phosphat/ 0,005 M EDTA) pH 8,0	500 µl
GSH (0-50 ng/50 µl)	50 µl
OPT (0,01 %, 0,1 %, 1,0 %)	50 µl

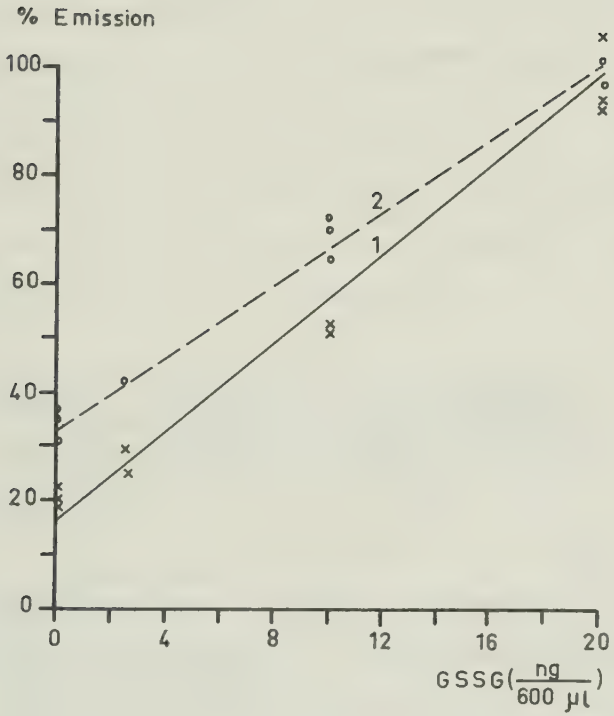


Abb. 20: Abhängigkeit der OPT-Fluoreszenz von GSSG und GSH bei Durchführung der GSSG-Bestimmung nach 3.1.2.5 aus einer Mischung von GSH und GSSG.
1) Abhängigkeit der Fluoreszenz von der GSSG-Konzentration zwischen 0 und 20 ng/600 µl
2) Abhängigkeit der Fluoreszenz von der GSSG-Konzentration zwischen 0 und 20 ng/600 µl bei gleichzeitiger Anwesenheit von GSH 20 ng/600 µl

Folgende Fluoreszenzen (% Emission) wurden erhalten:

GSH (ng/600 µl)	OPT 0,01 %	0,1 %	1 %
0	13	11	11
6,125	24	21	21
12,5	35	31,5	35,5
25	51,5	55	55
50	83	102	96,5

Tabelle 13: Abhängigkeit der durch den GSH-OPT-Komplex ausgelösten Fluoreszenzen von der OPT-Konzentration für GSH-Standardlösungen mit 0 bis 50 ng/600 µl. Die angegebenen Zahlen stellen Mittelwerte aus 3 Messungen dar.

Wie aus Tab. 13 hervorgeht, ergab eine Erhöhung der OPT-Konzentration auf das 10-fache (1 %) keine signifikante Steigerung der Fluoreszenz. Durch Verringerung der OPT-Konzentration auf 1/10 (0,01 %) können die Leerwerte nicht gesenkt werden, sondern scheinen im Gegenteil über denen zu liegen, die mit höheren OPT-Konzentrationen erhalten werden. Außerdem war bei den höchsten GSH-Konzentrationen die Fluoreszenz mit 0,01 % deutlich niedriger. Deshalb wurden alle weiteren Untersuchungen mit 0,1 % OPT ausgeführt.

5. Einfluß der Metall(Alkali)Ionenkonzentration auf Fluoreszenz bzw. Fluoreszenzlöschung

Metallionen können bei fluorimetrischen Messungen eine Art 'Quencheffekt' ausüben und dadurch eine teilweise Fluoreszenzlöschung bewirken (72). Um festzustellen, inwieweit das Testsystem durch den von uns verwendeten Phosphat-Puffer und die zur Enteiweißung verwendete Säure (MPA) beeinflußt wird, wurde je eine Eichkurve für GSH einmal in Phosphatpuffer (s.S. 69) und eine in 3 % MPA/15 % Na_3PO_4 nach folgenden Ansätzen aufgestellt:

Substanz	Volumen	
	Ansatz 1	Ansatz 2
GSH (0-100 ng/50 µl Phosphatpuffer)	50 µl	-
GSH (0-100 ng/50 µl MPA/Na_3PO_4)	-	50 µl
Puffer (0,1 M Phosphat/ 0,005 M EDTA) pH 8,0	1,0 ml	1,0 ml
OPT 0,1 %	50 µl	50 µl

Wie die Abb. 21 zeigt, ist in dem Ansatz mit MPA/Na_3PO_4 eine geringe Löschung der Fluoreszenz zu beobachten. Da die GSH- und GSSG-Bestimmungen der Proben nach der Denaturierung des Gewebes mit MPA und anschließender Neutralisation mit Na_3PO_4-Lösung ausgeführt wurden, war es erforderlich, auch die GSH- und GSSG-Bestimmungen für die Eichkurve in genau derselben MPA/Na_3PO_4-Lösung, die für die Proben

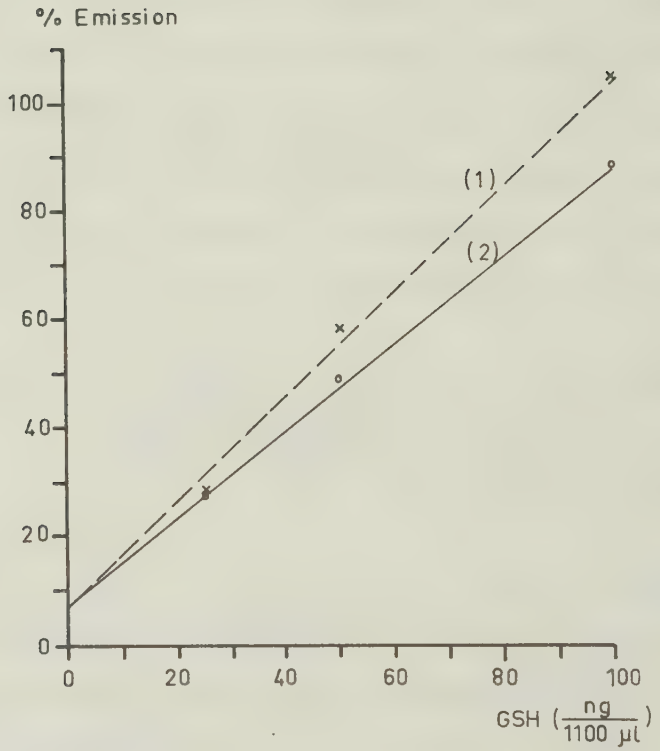


Abb. 21: Fluoreszenz von GSH-OPT in Puffer (0,1 M Phosphat/ 0,005 M EDTA) und in 3 % MPA/Na_3PO_4.

1) GSH (0-100 ng/1100 µl) gelöst in Puffer (0,1 M Phosphat/0,005 M EDTA)
2) GSH (0-100 ng/1100 µl) gelöst in 3 % MPA, die mit 15 % Na_3PO_4 neutralisiert worden war.

verwendet wurde, auszuführen.

3.1.2.4 Anwendung der modifizierten fluorimetrischen Methode zur Bestimmung von GSH und GSSG in Rattenleber

Nach Ausarbeitung der Modifikation zur GSH-GSSG-Bestimmung in Inseln wurde zunächst versucht, den Gehalt an GSH und GSSG in solchen Geweben zu bestimmen, von denen in der Literatur ausreichende Angaben über deren Konzentration vorliegen.

Aus Rattenleber wurden Homogenate (ungef. 50 mg/10 ml 3 % MPA) wie unter 3.1.2.2 beschrieben gewonnen. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde mit 3 % MPA so verdünnt, daß das Verhältnis Gewebe/Volumen MPA den Verhältnissen für die spätere Anwendung auf Inselgewebe entsprach, und zwar so, daß sich eine GSH-Konzentration von 0-20 ng/ 40 µl ergab. 40 µl Überstand wurden in den Test,wie auf Seite 91 beschrieben eingesetzt.

An GSH wurde in Rattenleber gefunden: 1705 µg/g Leber.

An GSSG wurde gefunden: 403 µg/g Leber (Mittelwert aus n = 3). Die in der Literatur angegebenen Werte schwanken zwischen 1220 und 3007 µg/g Gewebe für GSH und 0-288 µg/g für GSSG (Vgl. Tabelle 30).

Um weiterhin sicherzugehen, daß mit der von uns modifizierten Mikromethode auch tatsächlich alles oxidierte Glutathion erfaßt wird, wurde dem Leberhomogenat GSSG zugesetzt

und die Wiederfindungsrate bestimmt. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: Zu 40 µl des Zentrifugenüberstandes (siehe 3.1.2.2) wurden 10 µl 3 % MPA mit 36,3 ng GSSG/10 µl, zu weiteren 40 µl ein und desselben Überstandes 10 µl MPA ohne GSSG zugesetzt.

Die wie unter 3.1.2.5 beschrieben durchgeführte Bestimmung ergab folgende Werte:

	Probe Nr.	ohne Zusatz von GSSG gef. GSSG ng/50 µl	mit Zusatz von GSSG gef. GSSG ng/50 µl	wieder- gef. GSSG ng/50 µl	%
Überstand vom	1	105,6	130,6	25,0	
1. Homogenat	2	89,8	117,3	28,1	
	3	88,2	-		
Mittelwerte		94,5	123,9		
	berechnet aus den Mittelwerten:			29,5	81,1
Überstand vom	1	90,2	121,0	30,8	
2. Homogenat	2	96,1	132,6	36,5	
	3	94,4	130,6	36,2	
	4	-	136,4		
Mittelwerte		93,6	130,5		
	berechnet aus den Mittelwerten:			36,6	100,9

Tabelle 14: Wiederfindungsrate von GSSG, das zu den Zentrifugenüberständen von 2 Homogenaten aus einer Rattenleber (1. Homogenat 54,0 mg Leber/10 ml MPA, 2. Homogenat 74,0 mg Leber/10 ml MPA) zugesetzt wurde. (36,3 ng GSSG/50 µl).

Wie die Tabelle 14 zeigt, betrug die GSSG Recovery bei Versuch 1 81,1 %, bei Versuch 2 100,9 %.
Von Hissin und Hilf wurde eine Recovery von 95 % bis 105 % gefunden. Allerdings wurden bei ihrer Untersuchung 250 mg Leber in 4 ml MPA (siehe 3.1.2.2) mit dem Zusatz von 100 µg GSSG homogenisiert. Es handelte sich also um wesentlich höhere Konzentrationen sowohl an Gewebe als auch an zugesetztem GSSG, so daß der zu erwartende methodische Fehler erheblich kleiner war. Der methodische Fehler wird von diesen Autoren mit $\pm$ 10 % angegeben. Weiter wurde von ihnen mitgeteilt, daß die Werte für die Recovery beim Zusetzen von GSSG vor dem Homogenisieren nicht von denen verschieden waren, die nach Zusatz von GSSG zum Homogenat erhalten wurden.

3.1.2.5 Anwendung der Orthophthaldialdehyd-Methode auf Inselgewebe

Als weitere Untersuchung sollte geklärt werden, ob die von uns modifizierte Mikromethode auch bei der Anwendung auf Inselgewebe zuverlässige Werte liefert. Pankreasinseln wurden nach der Vorinkubation (siehe 3.2.3) wie unter 3.2.5 beschrieben trockengesaugt, homogenisiert und zentrifugiert. Von jeder Probe wurden 2 x 40 µl des Überstandes abgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt.

Bestimmung von GSH

Man gab zu jeder Probe (40 µl) soviel Trinatriumphosphatlösung, daß sich ein pH-Wert von 8 einstellte. (Das dazu nötige Volumen, 22-24 µl einer 15 %igen Na_3PO_4-Lösung, wurde von Zeit zu Zeit durch Titration überprüft, da die MPA leicht hydrolysiert.) Nach Zugabe von 0,5 ml Phosphatpuffer pH 8 nach Abschnitt 3.1.2.2 pipettierte man im 30-Sekunden Abstand zu jeder Probe 50 µl OPT-Reagenz-Lösung und durchmischte gut. Nach einer Reaktionsdauer von 15 min bei Raumtemperatur erfolgte die fluorimetrische Messung, ebenfalls im 30-Sekunden-Abstand.
Für die Eichkurve wurde folgende Verdünnungsreihe in der gleichen Weise wie die Proben behandelt: 20, 15, 10, 7,5, 5, 2,5 und 0 ng GSH, jeweils in 40 µl MPA gelöst.

Testansatz zur GSH-Bestimmung:

Substanz	Volumen
Puffer (0,1 M Phosphat/ 0,005 M EDTA) pH 8,0	500 µl
Probenlösung mit 0-10 ng/60 µl GSH	60 µl
OPT (1 mg/ml)	50 µl

Bestimmung von GSSG

Von jeder Probenlösung wurden 40 µl in Reaktionsgefäße, die bereits 20 µl einer NEM-Lösung (2 mM) enthielten, einpipettiert. Dann wurde mit 15 % Na_3PO_4-Lösung neutralisiert, mit dem Whirlmix gut durchmischt und 30 min lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Durch Zugabe von 0,5 ml 0,1 N NaOH stellte man auf pH 12 ein. Danach pipettierte man wieder - wie schon vorher beschrieben - alle 30 Sekunden OPT-Reagenzlösung zu und bestimmte die Fluoreszenz der Proben nach 15 Minuten.
Die Verdünnungsreihe für die Eichkurve wurde in gleicher Weise wie bei der GSH-Bestimmung beschrieben erstellt.

Testansatz zur GSSG-Bestimmung:

Substanz	Volumen
NEM (2 mM)	20 µl
Probenlösung (0-10 ng GSSG/40 µl)	40 µl
Na_3PO_4 (15 %)	20 µl
30 min bei Zimmertemperatur stehenlassen	
NaOH ($0,1_N$)	500 µl
OPT (1 mg/ml)	50 µl

Um festzustellen, wie groß die Streuungen der Methode bei

Bestimmung aus ein und demselben Homogenat waren, wurden wie folgt Doppelbestimmungen durchgeführt:
Zwischen 5 und 10 Inseln/Eppendorfgefäß wurden wie unter 3.2.5 beschrieben homogenisiert und zentrifugiert. Anschließend wurden 2 mal 40 µl des Zentrifugenüberstandes entnommen und wie auf Seite 91 beschrieben die GSH-Bestimmung durchgeführt.
Folgende Werte wurden erhalten:

Probe Nr.	Bestimmung a) GSH ng/40 µl	Bestimmung b) GSH ng/40 µl	Mittelwert ng/40 µl
1	5,1	4,6	4,9
2	7,6	6,9	7,3
3	2,3	2,9	2,6
4	2,8	2,4	2,6
5	3,7	3,9	3,8

Tabelle 15: Doppelbestimmung von GSH aus ein und demselben Inselhomogenat.

Wie aus Tab. 15 hervorgeht, liegen die Doppelbestimmungen relativ gut beisammen. Aus diesem Grunde wurde für die unter 3.2.4 beschriebenen Versuche auf Doppelbestimmungen verzichtet. Stattdessen wurden mit je 40 µl des Überstandes die GSH- und die GSSG-Bestimmungen durchgeführt (siehe Seite 91 und 92).

3.1.2.6 GSSG-Wiederfindung

Um, wie schon von uns bei Leberhomogenaten untersucht, auch bei Inselgewebe festzustellen, ob alles GSSG bei der Bestimmung erfaßt wird, wurde die Wiederfindungsrate bestimmt.

Dazu wurden 40 µl Zentrifugenüberstand von Inselhomogenaten (5-10 Inseln/100 µl MPA, siehe 3.2.5) mit 20 µl Phosphatpuffer,der 10 ng GSSG/20 µl enthielt, versetzt, zu weiteren 40 µl ein und desselben Extraktes wurden 20 µl Puffer ohne GSSG zugegeben. Anschließend erfolgte die GSSG-Bestimmung wie unter 3.1.2.4 beschrieben.

Es wurden folgende Werte gefunden:

Probe Nr.	ohne Zusatz gefunden GSSG (ng/60 µl)	mit GSSG Zusatz gefunden GSSG (ng/60 µl)	wiedergefunden GSSG ng	Wiederfindungsrate %
1	6,3	19,5	13,2	132
2	14,3	26	11,7	117
3	5,4	13,7	8,3	83
4	11,9	17,8	5,9	59
5	2,8	13,7	10,9	109
6	2,2	11,9	9,7	97
7	5,4	16	10,6	106

Tabelle 16: Bestimmung der Wiederfindungsrate für GSSG, das dem Überstand von Inselhomogenat zugesetzt wurde. Best. 1) gef. GSSG ohne GSSG-Zusatz Best.2) gef. GSSG nachdem 10 ng GSSG zugesetzt worden waren.

Wie aus Tabelle 16 hervorgeht, wurden im Mittel ca. 100 % des zugesetzten GSSG wiedergefunden. Dies läßt trotz der Streuung vermuten, daß während der Bestimmung kein GSSG verloren geht.

3.1.2.7 GSH-Wiederfindung

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate von GSH wurde in gleicher Weise ausgeführt wie bei GSSG (3.1.2.6). GSH wurde in 0,1 N HCl gelöst (10 ng/20 µl), um Oxidation zu GSSG zu verhindern. Im 1. Ansatz wurden dann 20 µl 0,1 N HCl ohne GSH, im 2. Ansatz 20 µl mit 10 ng GSH zugesetzt.

Probe Nr.	1.ohne Zusatz gefunden GSH ng/60 µl	2.mit GSH Zusatz gefunden GSH ng/60 µl	Wiedergefunden ng	Wiederfindungsrate %
1	5,5	13,4	7,9	79
2	11,4	22,5	11,1	111
3	6,1	16,7	10,6	106
4	5	13,4	8,4	84
5	11,2	21,5	10,3	103
6	0,3	10,6	10,3	103
7	2,5	13,4	10,9	109

Tabelle 17: Bestimmung der Wiederfindungsrate für GSH, das dem Zentrifugenüberstand von Inselhomogenaten zugesetzt worden war.
1. Best.: gefunden GSH ohne GSH-Zusatz
2. Best.: gefunden GSH nach Zusatz von 10 ng GSH.

Wie aus Tabelle 17 hervorgeht, wurden vom zugesetzten GSH im Schnitt 99 % wiedergefunden. Damit konnte gezeigt werden, daß die von uns modifizierte Mikromethode den für unsere Fragestellung erforderlichen Anforderungen genügt.

Vorteile der fluorimetrischen GSH-GSSG-Bestimmung mit OPT gegenüber der Cycling Methode

1. Während der zeitliche Aufwand mit der Cycling-Methode für 50 Proben 2-3 Stunden betrug, konnte mit der fluorimetrischen Methode die gleiche Anzahl von Proben in 1,2 Stunden gemessen werden.
2. Ungenauigkeiten bei der Bestimmung von GSSG, wie sie bei der Cycling-Methode durch den Ausätherungsvorgang für NEM zu befürchten sind, entstehen bei der fluorimetrischen Methode nicht, da NEM nicht ausgeäthert wird.
3. Da GSH als solches bei der fluorimetrischen Methode getrennt von GSSG bestimmt wird (im Gegensatz zur Cycling-Methode, bei der GSH durch Subtraktion von GSSG vom Gesamtglutathion ermittelt wird) ist mit einer größeren Genauigkeit zu rechnen.
4. Eine Glutathionbestimmung kostet bei der Cycling-Methode ca. 2,50 DM/100 Proben, bei der fluorimetrischen ca. 1,10 DM/100 Proben.
5. Die von uns anschließend verwendeten Thiolreagenzien, die mit dem Inselgewebe in den Test gelangen, stören die fluorimetrische Methode nicht.

Für unsere Versuche an Inselgewebe wurden zunächst die Abhängigkeit von insulärem GSH und GSSG von der Glucosekonzentration untersucht. Bei diesen Experimenten wurde sowohl die Cycling-Methode als auch die fluorimetrische Methode eingesetzt, um zu prüfen, ob mit beiden Methoden zumindest quantitativ ähnliche Ergebnisse erhalten werden. Bei den Versuchen, die die Anwendung von Stoffwechselhemmstoffen (Methylenblau, Diamid, t-BHP) einschlossen, wurde ausschließlich die fluorimetrische Methode angewandt.

3.2 Isolierung Langerhansscher Inseln nach Lacy und Kostianovsky (73)

3.2.1 Operation

Die Ratten wurden mit Äther narkotisiert und das Abdomen durch einen Längsschnitt vom Becken bis zum Brustbein und je einem Querschnitt im Becken und unter den Rippenbögen eröffnet. Unter dem Leberlappen wurde das Duodenum mit einer Pinzette hervorgezogen, um den Ductus pancreaticus sichtbar zu machen, der nun zur Leber hin abgebunden wurde. Dann wurden durch den Ductus pancreaticus 10 ml einer eisgekühlten Hanks' Lösung in das Pankreas injiziert.

Mit einer Schere wurde das nun deutlich sichtbare Pankreas von Darm, Magen, Milz und Leber getrennt, in eine mit

Hanks' Lösung gefüllte Petrischale gelegt und sämtliche Fettpartikel entfernt.

3.2.2 Isolierung der Langerhansschen Inseln

Das Pankreas wurde gleichmäßig mit einer kleinen Schere so fein zerschnitten, daß man die Teilchen mit dem Konus einer 5 ml Recordspritze aufsaugen kann. Das Volumen wurde auf 5 ml mit Hanks' Lösung ergänzt und der gesamte Inhalt der Spritze daraufhin in ein 20 ml Schnappdeckelglas, in welchem sich 30 mg Collagenase befanden, überführt.
In einem bei 38°C thermostatisierten Schüttelbad ließ man unter Schütteln die Collagenase solange auf das Pankreasgewebe einwirken, bis eine homogene hellbraune schleimige Flüssigkeit entstanden war (ca. 10-15 Minuten, je nach Aktivität der Collagenase und Größe der Pankreaspartikel).

Anschließend wurde der gesamte Inhalt in ein kleines Becherglas gegeben, 3 mal durch den Konus der 5 ml Recordspritze gesaugt (zur weiteren mechanischen Zerkleinerung) und durch ein Plastiksieb in einen mit ca. 15 ml eiskalter Hanks' Lösung gefüllten Meßzylinder gebracht. Auf diese Weise wurde die Collagenasereaktion abgestoppt. Wegen der unterschiedlichen Dichte von exokrinen Partikeln und Inseln war es möglich, beide voneinander zu trennen und zwar indem man die Inseln absetzen ließ, den Überstand absaugte und erneut mit Hanks' Lösung aufschwemmte. Dieser Vorgang wurde ca. 10 mal wiederholt, bis der größte Teil

des exokrinen Gewebes entfernt war und die isolierten Inseln am Boden des Gefäßes mikroskopisch zu erkennen waren.

Es wurde dabei stets bei $0^{o}C$ gearbeitet. Durch sorgfältiges Auslesen mit einer Mikropipette wurden die Inseln unter einem Stereomikroskop vollständig vom exokrinen Gewebe getrennt und zur Vorinkubation überführt.

3.2.3 Vorinkubation der Langerhansschen Inseln

Zur Regeneration des Stoffwechsels nach dem Isolierungsprozeß wurden die nach obigem Verfahren gewonnenen Inseln 30 Minuten lang vorinkubiert. Man überführte die Inseln in ein 5 ml Gläschen, welches 2-3 ml einer Krebs-Ringer-Bicarbonat Lösung (pH 7,35) nach Abschnitt 2.3.2.1 und zusätzlich eine substimulatorische Glucosemenge (1 mg/ml) enthielt. Das Gläschen wurde mit einem Gummistopfen verschlossen, über eine Kanüle mit Carbogen (95 % O_2 + 5 % CO_2) begast und im Wasserbad 30 Minuten lang bei $37^{o}C$ langsam geschüttelt. Um die Inseln von eventuell anhaftendem Insulin zu befreien, wurden sie anschließend dreimal mit eiskalter Hanks' Lösung gewaschen.

3.2.4 Hauptinkubation

Jeweils fünf Inseln wurden unter Eiskühlung mit der Mikropipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß[x)] einsortiert und mit 1 ml Hauptinkubationsmedium (KRB-Puffer nach Abschnitt 2.3.2.1) versetzt. Die Inseln wurden dann 15 bzw. 90 Minuten lang unter Begasung mit Carbogen und langsamem Schütteln bei 37°C inkubiert.
Nach Ablauf der Inkubationsdauer wurden die Gläschen in ein Eisbad gestellt, um durch den Temperatursturz alle Stoffwechselvorgänge zu unterbrechen. Danach wurden sie bei 2°C in der vorgekühlten Zentrifuge fünf Minuten lang mit 2000 U/min zentrifugiert.

3.2.5 Aufbereitung der Inseln zur Metabolitenbestimmung (siehe auch Abb. 22)

Nach dem Zentrifugieren wurden die Inseln unter einem Stereomikroskop in der Kälte mit einer Kanüle, die durch einen Schlauch mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden war, bis auf ein Restvolumen von etwa 100 µl trockengesaugt und nochmals gezählt. Dann wurden die Fläschen sofort in flüs-

---

x) Reaktionsgefäße aus Polyäthylen (Volumen 1,5 ml, Best.-Nr. 3811) der Fa. Eppendorf Gerätebau, Netheler und Hinz

sigem Stickstoff eingefroren. In einer vorgekühlten Christ Gefriertrockenanlage wurden die Inseln dann lyophilisiert. Nach Beendigung dieses Vorgangs wurde jede Probe zur Eiweißfällung mit 100 µl eisgekühlter 3 %iger MPA versetzt und in einem eisgekühlten Ultraschallbad 20 min lang bei 40 000 Hz homogenisiert. Zur Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile wurden die Proben dann 1 h lang in einer Kühlzentrifuge bei 20 000 x g und $0^{o}C$ zentrifugiert. Im Überstand befand sich das freie, d.h. nicht proteingebundene Glutathion. Zur Glutathionbestimmung wurden 2 mal 40 µl des Überstandes entnommen. Der Zeitraum zwischen Beendigung der Inkubation und dem Gefrierstop betrug max. 7 min. Während dieser Zeit wurden die Proben aber gut gekühlt, so daß eine Oxidation des GSH nicht zu befürchten war. Sobald die Inseln mit eisgekühlter 3 % MPA versetzt waren, konnte wegen des niedrigen pH-Wertes eine Oxidation des GSH ausgeschlossen werden.

3.2.6 Versuchsauswertung

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte nach Aufstellung der Eichkurven (Berechnung des Pearson-Bravaisschen Korrelationskoeffizienten und der Koeffizienten A und B der linearen Regressionsfunktion $y = A + B\,x$ mit einem Olivetti Tischcomputer) und Berechnen der Werte für die unbekannten Proben.

Die angegebenen Meßwerte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM dar, er-

Inkubation der Inseln (15 bzw. 90 min)

↓

Zentrifugation 5 min mit 2000 U/min bei 2°C

↓

bei weiterem Kühlen unter einem Stereomikroskop mit Wasserstrahlpumpe trockensaugen und zählen der Inseln

↓

in flüssigem N_2 eingefrieren

↓

lyophilisieren

↓

mit 100 µl eisgekühlter 3 % MPA versetzen

↓

20 min im Ultraschallbad bei +2°C homogenisieren

↓

in der Kühlzentrifuge bei 0°C 1 h lang mit 20 000 g zentrifugieren

↓

Überstand für die Metaboliten-Bestimmung abnehmen

Abb. 22: Schema zur Gewebsaufbereitung nach der Inkubation der Langerhansschen Inseln.

rechnet aus der Anzahl der in Klammer angegebenen Versuche (n).

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde nach Student's t-Test bestimmt, wobei ein t-Test, entsprechend der Geigy-Tabelle für $p < 0,05$ als signifikant angesehen wurde (74)

Zur Korrelation verschiedener Parameter wurde ebenfalls nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate eine Regressionsgerade berechnet.

Zur Berechnung der molaren Konzentration von GSH und GSSG wurden folgende Molekulargewichte zugrunde gelegt, sofern in den Tabellen und Abbildungen nicht anders angegeben:

GSH: Mol.-Gewicht = 307,3

GSSG: Mol.-Gewicht = 612,6

4. VERSUCHSERGEBNISSE

4.1 Einfluß von Glucose auf GSH, GSSG, lösliches Gesamtglutathion sowie den GSH/GSSG-Quotienten, gemessen unter Verwendung der Cycling Methode

4.1.1 Gesamtglutathion

Die Abb. 23 und Tab. 18 zeigen den Einfluß von 1-4 mg/ml Glucose auf den Gehalt isolierter Pankreasinseln der Ratte an Gesamtglutathion und zwar nach einer Inkubationsdauer von 15 (Abb. 23a) oder 90 Minuten (Abb. 23b). Während es bei 15-minütiger Inkubationszeit zu keiner von der Glucosekonzentration abhängigen Zunahme des Gesamtglutathions kam, fand sich eine von der Glucosekonzentration abhängigeSteigerung bei Inkubation über 90 min, die bei 3 mg/ml Glucose statistisch signifikant war.

4.1.2 Reduziertes Glutathion

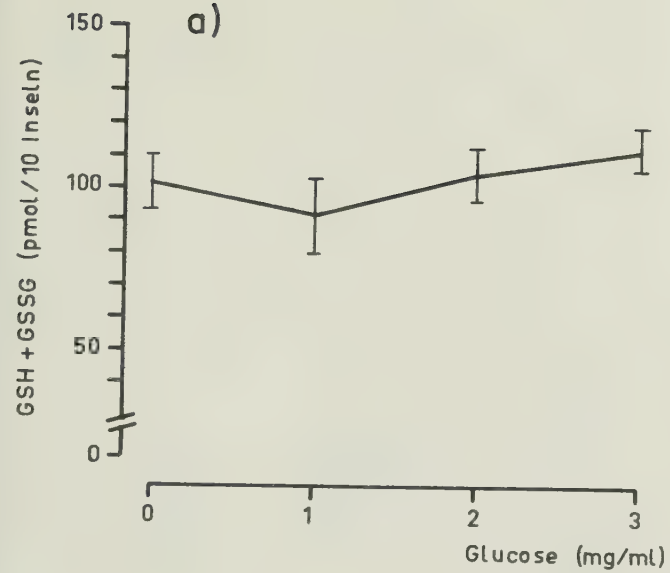
Wesentlich ausgeprägter als die Erhöhung der Konzentration an Gesamtglutathion war die des GSH durch 1, 2, 3 mg/ml Glucose (Abb. 24 und Tab. 19). Wie die Abb. 24 und Tab. 19 weiter zeigen, ist die Steigerung des GSH abhängig von der Glucosekonzentration. Stellt man die GSH-Werte bei 15-minütiger Inkubation denen nach 90-minütiger Inkubation ge-

Tabelle 18: Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf den Gehalt an gelöstem Gesamtglutathion (GSH+GSSG) Langerhansscher Inseln von Ratten. Angabe in pmol GSH / 10 Inseln (Mittelwerte ± SEM). Die GSH- und GSSG-Bestimmungen erfolgten durch enzymatic cycling (siehe 3.1.1.3.7).

Inkubationszeit	Glucosekonzentration (mg/ml)				
	0 Kontrolle	1	2	3	4
15 min	101,1 ± 9,1 (25) A	91,6 ± 11,9 (24) B	104,4 ± 9,2 (30) C	112,3 ± 7,3 (31) D	-
90 min	82,1 ± 8,3 (37) E	107,3 ± 12,7 (37) F	103,4 ± 10,3 (38) G	138,6 ± 12,7 (46) H	132,7 ± 12,7 (41) I

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung: AB: n.s. AC: n.s. AD: n.s. EF: n.s. EG: n.s. EH: P <0,001 EI: P <0,01 GH: P <0,05 GI: n.s. AE: n.s. BF: n.s. CG: n.s. DH: n.s.



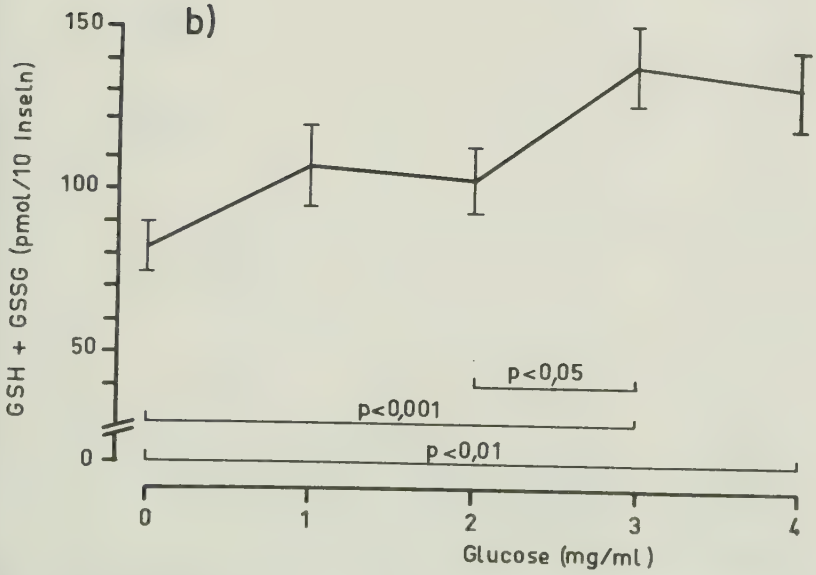


Abb. 23: Einfluß von Glucose auf den Gehalt an Gesamtglutathion (GSH + GSSG) Langerhansscher Inseln der Ratte bei
a) 15-minütiger Inkubation
b) 90-minütiger Inkubation
Mittelwerte + SEM, Anzahl der Versuche (n = 25-46), ausgedrückt in pmol GSH.

Tabelle 19: Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf den Gehalt an GSH Langerhansscher Inseln von Ratten. Angabe in pmol GSH / 10 Inseln (Mittelwerte ± SEM). Die GSH Bestimmung erfolgte durch enzymatic cycling (unter 3.1.1.3.7 beschrieben).

Inkubationszeit	Glucosekonzentration (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
15 min	37,0 ± 5,2 (22) A	48,1 ± 6,1 (24) B	56,1 ± 5,5 (28) C	78,7 ± 6,9 (29) D	-
90 min	36,4 ± 5,3 (34) E	45,8 ± 6,6 (26) F	49,2 ± 5,5 (31) G	56,6 ± 6,4 (33) H	50,5 ± 6,6 (27) I

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung:

AB: n.s.
AC: P <0,05
AD: P <0,001
BD: P <0,01
CD: P <0,02
EF: n.s.
EG: n.s.
EH: P <0,02
EI: n.s.
AE: n.s.
BF: n.s.
CG: n.s.
DH: P <0,02

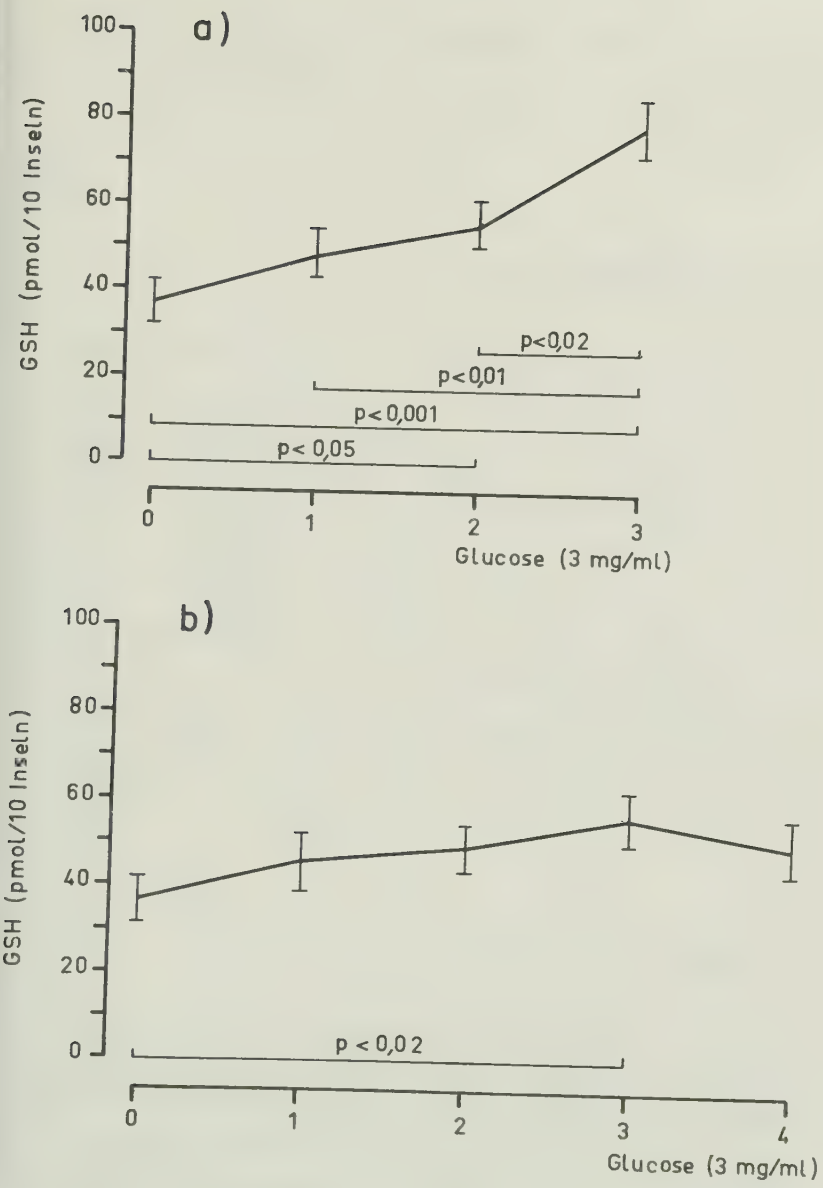


Abb. 24: Einfluß von Glucose auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte bei
a) 15-minütiger Inkubationsdauer
b) 90-minütiger Inkubationsdauer
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche (n = 22-37)

genüber, so liegen erstere höher als die nach 90 Minuten. Der Unterschied ist in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose statistisch signifikant.

4.1.3 Oxidiertes Glutathion (GSSG)

Abb. 25 und Tab. 20 zeigen die Ergebnisse entsprechender Versuche beim GSSG. Nach 15-minütiger Inkubation findet sich eine von der Glucosekonzentration abhängige, signifikante Abnahme des insulären GSSG über den gesamten Konzentrationsbereich, was bei 90-minütiger Inkubation nicht der Fall war. Vergleicht man jedoch den Glucoseeinfluß von 15-minütiger mit dem von 90-minütiger Inkubation, so zeigt sich, daß unter dem Einfluß von 1 und 2 mg/ml nach 90 min der GSSG-Gehalt gegenüber dem nach 15 min signifikant erniedrigt war. Dagegen findet man in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose keinen Unterschied.

4.1.4 $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient (Redox-Status)

Berechnet man den GSH/GSSG-Quotienten nach 15 bzw. 90-minütiger Inkubation, so zeigt sich bei den Versuchen über 15 Minuten ein deutlicher, von der Glucosekonzentration abhängiger Anstieg (siehe Tab. 21 und Abb. 26). Bei den Versuchen über 90 Minuten war ein Anstieg nur zwischen 0 und 1 mg/ml Glucose zu sehen, bei 2 mg Glucose erfolgte

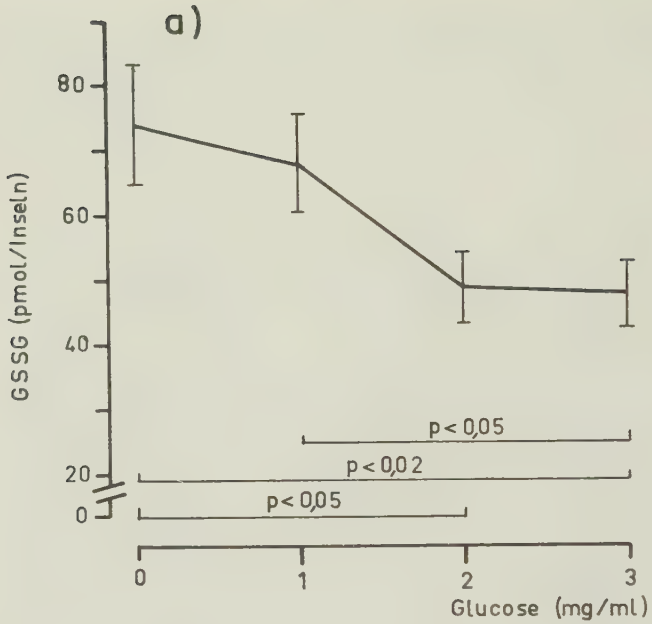
Tabelle 20: Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf den Gehalt an GSSG Langerhansscher Inseln von Ratten. Angabe in pmol GSSG / 10 Inseln (Mittelwerte ± SEM). Die GSSG Bestimmungen erfolgten durch enzymatic cycling (unter 3.1.1.3.7 beschrieben).

Inkubationszeit	Glucosekonzentration (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
15 min	37,0 ± 4,7 (27) A	33,9 ± 3,8 (32) B	24,4 ± 2,7 (32) C	23,6 ± 2,5 (32) D	-
90 min	25,7 ± 2,8 (41) E	17,0 ± 2,8 (28) F	14,9 ± 2,7 (31) G	23,8 ± 3,2 (38) H	26,7 ± 4,5 (39) I

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung:

AB: n.s.
AC: P <0,05
AD: P <0,02
BC: n.s.
BD: P <0,05
EF: n.s.
EG: P < 0,02
EH: n.s.
EI: n.s.
GI: P < 0,05
AE: P <0,05
BF: P <0,01
CG: n.s.
DH: n.s.



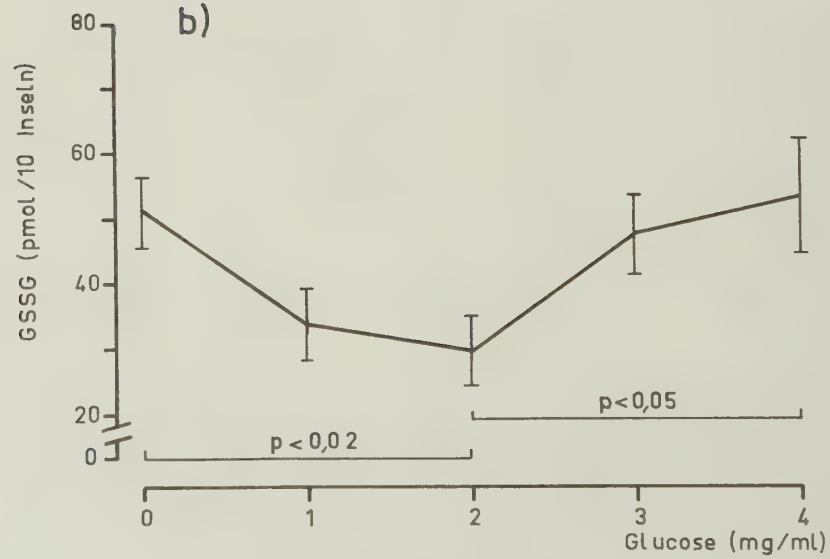


Abb. 25: Einfluß von Glucose auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte bei
a) 15-minütiger Inkubation
b) 90-minütiger Inkubation
Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche (n = 27-41)
Der GSSG-Gehalt wurde als pmol GSH berechnet (1 pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

Tabelle 21: Einfluß von verschiedenen Glucosekonzentrationen auf den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln von Ratten. Die GSH-GSSG Bestimmungen erfolgten durch enzymatic cycling (unter 3.1.1.3.7 beschrieben). Die Quotienten wurden aus den in Tab. 19 und 20 angegebenen Mittelwerten für GSH und GSSG berechnet.

Inkubations-zeit	Glucose-Konzentration (mg/ml)				
	0	1	2	3	4
15 min	0,69	1,14	1,57	2,11	-
90 min	0,70	1,30	1,30	1,10	0,90

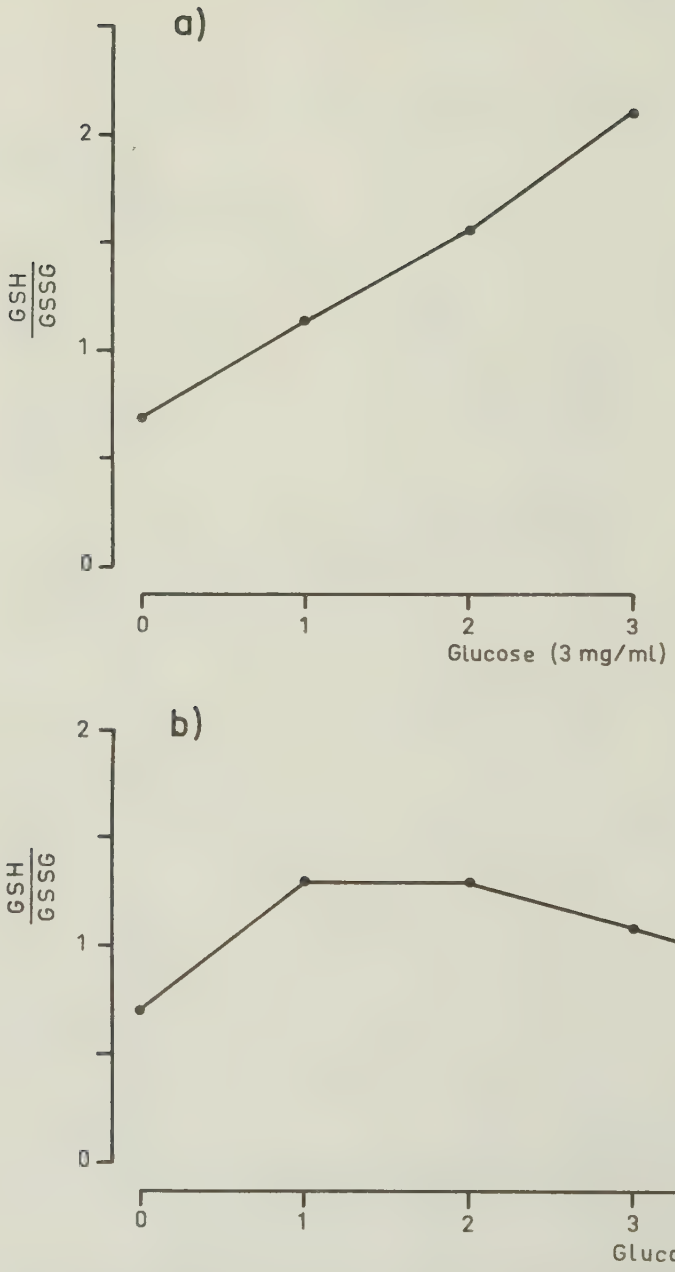


Abb. 26: Einfluß von Glucose auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte bei
a) 15-minütiger Inkubationsdauer
b) 90-minütiger Inkubationsdauer
Die Berechnung der Quotienten erfolgte aus den in Tab. 19 und 20 angegebenen Mittelwerten.

kein weiterer Anstieg, bei 3 und 4 mg/ml sogar wieder eine Abnahme.

4.2 Einfluß von Glucose auf GSH, GSSG und den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten, gemessen unter Verwendung der OPT-Methode

Wie die Abb. 27 und Tab. 22 zeigen, führten 3 mg/ml Glucose gegenüber 1 mg/ml bei 15-minütiger Inkubation zu einer signifikanten Zunahme von GSH, zu einer Abnahme von GSSG und damit zu einem Anstieg des GSH/GSSG-Quotienten.

Wie die Tab. 23 zeigt, sind die Werte, die mit der OPT-Methode erhalten wurden, nicht signifikant von denen unterschieden, die mit enzymatic cycling erhalten wurden. Beide Methoden liefern somit qualitativ und quantitativ etwa gleiche Resultate.

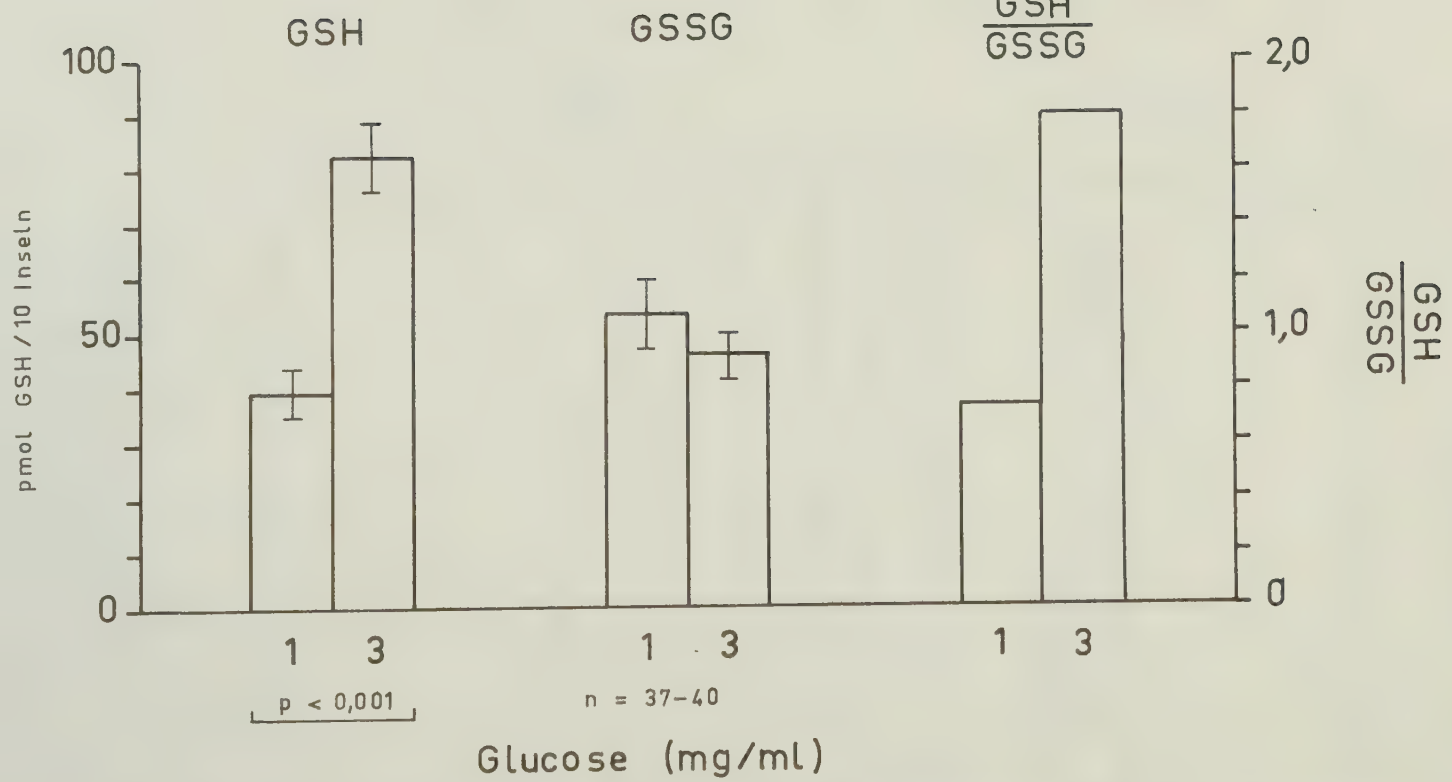


Abb. 27: **Einfluß** von Glucose auf GSH-, GSSG-Gehalt und **GSH/GSSG**-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation, gemessen unter Verwendung der OPT-Methode. GSH, GSSG: Mittelwerte ± SEM. Anzahl der Versuche (n). Die Mittelwerte zur Berechnung der GSH/GSSG-Quotienten wurden Tab. 22 entnommen. Der GSSG-Gehalt wurde in pmol GSH ausgedrückt (1 pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

Tabelle 22: Einfluß von Glucose auf den GSH-, GSSG-Gehalt und $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln nach 15-minütiger Inkubation. Bestimmung nach der OPT-Methode (siehe 3.1.2.5).

Parameter	Glucosekonzentration (mg/ml)	
	1	3
GSH pmol/10 Inseln ± SEM	39,6 ± 4,5 (41) A	82,8 ± 6,1 (48) B
GSSG pmol/10 Inseln ± SEM	26,7 ± 3,2 (38) C	23,0 ± 2,2 (37) D
$\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten	0,74	1,8

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung: AB: P <0,001
CD: n.s.

Tabelle 23: Vergleich der Ergebnisse, die mit den beiden modifizierten Mikromethoden (enzymatic cycling und OPT-Methode) unter gleichen Versuchsbedingungen erhalten wurden. Gemessen wurde der Einfluß von Glucose 1 mg/ml und 3 mg/ml auf den GSH-, GSSG-Gehalt und $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte bei 15-minütiger Inkubationsdauer (pmol GSH bzw. pmol GSSG/10 Inseln ± SEM).

Bestimmungs-methode	Glucosekonzentration (mg/ml) gemessene Parameter					
	GSH		GSSG		$\frac{GSH}{GSSG}$	
	1	3	1	3	1	3
Enzymatic cycling	48,1 ± 6,1 (24) A	78,7 ± 6,9 (29) B	33,9 ± 3,8 (32) C	23,6 ± 2,5 (32) D	1,1	2,1
OPT-Methode	39,6 ± 4,5 (41) E	82,8 ± 6,1 (48) F	26,7 ± 3,2 (38) G	23,0 ± 2,2 (37) H	0,7	1,8

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung:

AB: P <0,01
EF: P <0,001
CD: P <0,05
GH: n.s.

AE: n.s.
BF: n.s.
CG: n.s.
DH: n.s.

4.3 Einfluß von Methylenblau auf den GSH-, GSSG-Gehalt und $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln, gemessen unter Verwendung der OPT-Methode

Bei Anwesenheit von 1 µg/ml, 2 µg/ml und 5 µg/ml MB in Gegenwart von Glucose 3 mg/ml im Inkubationsmedium wurde, wie Tab. 24 und Abb. 28 zeigen, der Gehalt an GSH dosisabhängig und signifikant nach 15-minütiger Inkubation gesenkt.
Gleichzeitig wurde der Gehalt an GSSG ebenfalls dosisabhängig und signifikant erhöht (Abb. 29).
Damit verbunden war die Senkung des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten von 1,8 bis auf 0,50. Schon in der Konzentration von 1 µg/ml senkte MB den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten auf 0,9 (Abb. 30).

4.4 Einfluß von t-BHP auf den GSH-, GSSG-Gehalt und $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln, gemessen unter Verwendung der OPT-Methode

Durch Inkubation mit 0,5; 1,0; 2,0 mM t-BHP und 3 mg/ml Glucose im Inkubationsmedium konnte der Gehalt an GSH vermindert werden. Abb. 31 und Tab. 25 zeigen, daß t-BHP bereits in der Konzentration 0,5 mM nach 15-minütiger Inkubation den GSH-Gehalt signifikant senkte. Durch t-BHP, einem Co-Substrat der Glutathionperoxidase, konnte wegen der hohen Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms (turnover=$10^8 M^{-1} sec^{-1}$ (74))

Tabelle 24: Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an Methylenblau auf den Gehalt an GSH, GSSG und den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von Glucose (3 mg/ml). Die Bestimmungen erfolgten nach der unter 3.1.2.5 angegebenen OPT-Methode.

Parameter	Methylenblaukonzentrationen (µg/ml)			
	0 Kontrolle	1	2	5
GSH pmol ± SEM /10 Inseln	85,8 ± 9,7 (20) A	45,1 ± 3,9 (61) B	39,3 ± 4,1 (48) C	33,9 ± 2,0 (59) D
GSSG pmol ± SEM /10 Inseln	23,3 ± 2,1 (10) E	25,1 ± 2,6 (53) F	29,1 ± 2,4 (42) G	33,5 ± 2,5 (62) H
$\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient	1,8	0,9	0,68	0,50

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung: AB: P <0,001 EF: n.s.
AC: P <0,001 EG: n.s.
AD: P <0,001 EH: n.s.
FH: P <0,05

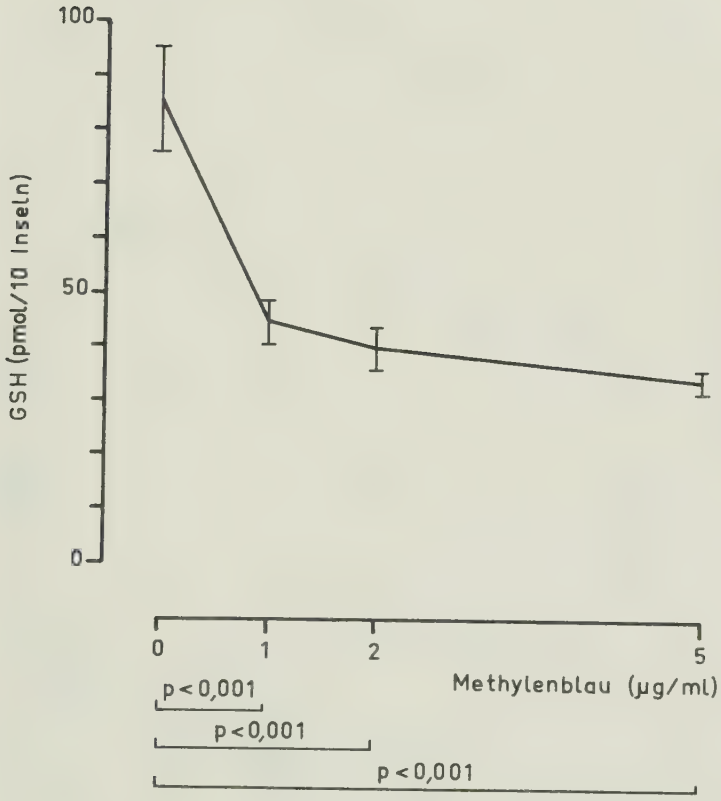


Abb. 28: Einfluß von Methylenblau auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche (n = 20-62).

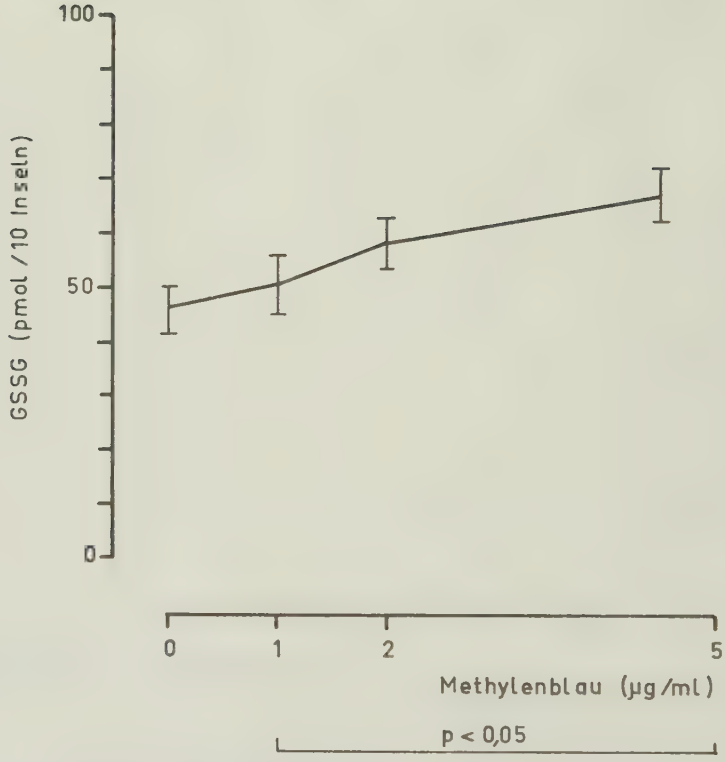


Abb. 29: Einfluß von Methylenblau auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche (n = 10-62). Der GSSG-Gehalt wurde als pmol GSH berechnet (1 pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

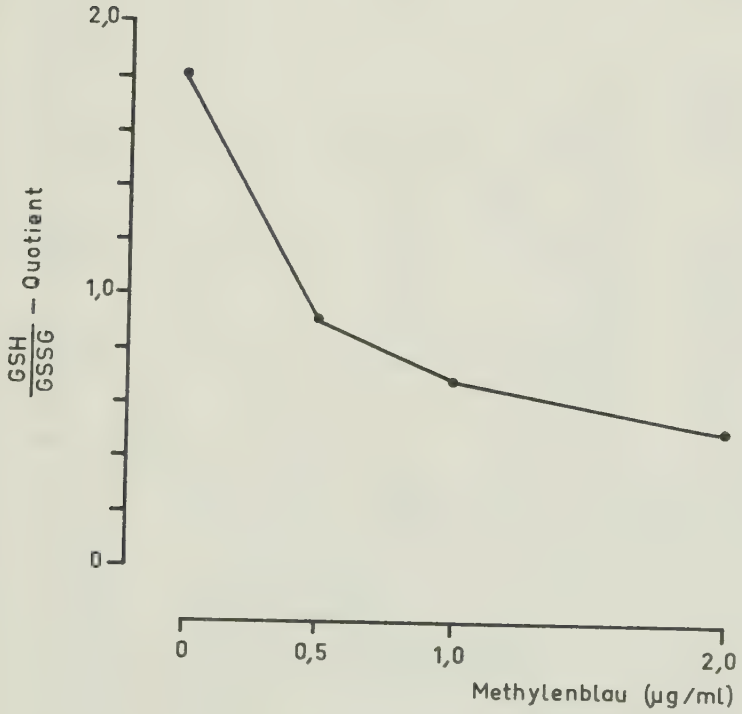


Abb. 30: Einfluß von Methylenblau auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Die Mittelwerte für die Berechnung der Quotienten wurden Tab. 24 entnommen.

Tabelle 25: Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an t-Butyl-Hydroperoxid auf den Gehalt an GSH, GSSG und den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln von Ratten nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von Glucose (3 mg/ml). Die Bestimmungen erfolgten nach der unter 3.1.2.5 angegebenen OPT-Methode.

Parameter	t-BHP-Konzentrationen (mM)			
	0	0,5	1,0	2
GSH pmol ± SEM /10 Inseln	84,5 ± 11,7 (23) A	57,0 ± 7,6 (35) B	50,5 ± 7,8 (19) C	28,4 ± 2,6 (19) D
GSSG pmol ± SEM /10 Inseln	26,6 ± 4,2 (16) E	45,2 ± 5,3 (28) F	46,2 ± 5,4 (22) G	42,6 ± 5.3 (25) H
$\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten	1,56	0,63	0,54	0,33

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung: AB: P <0,05 AC: P <0,05 AD: P <0,001 BD: P <0,02 CD: P <0,02 EF: P <0,05 EG: P <0,02 EH: P <0,05

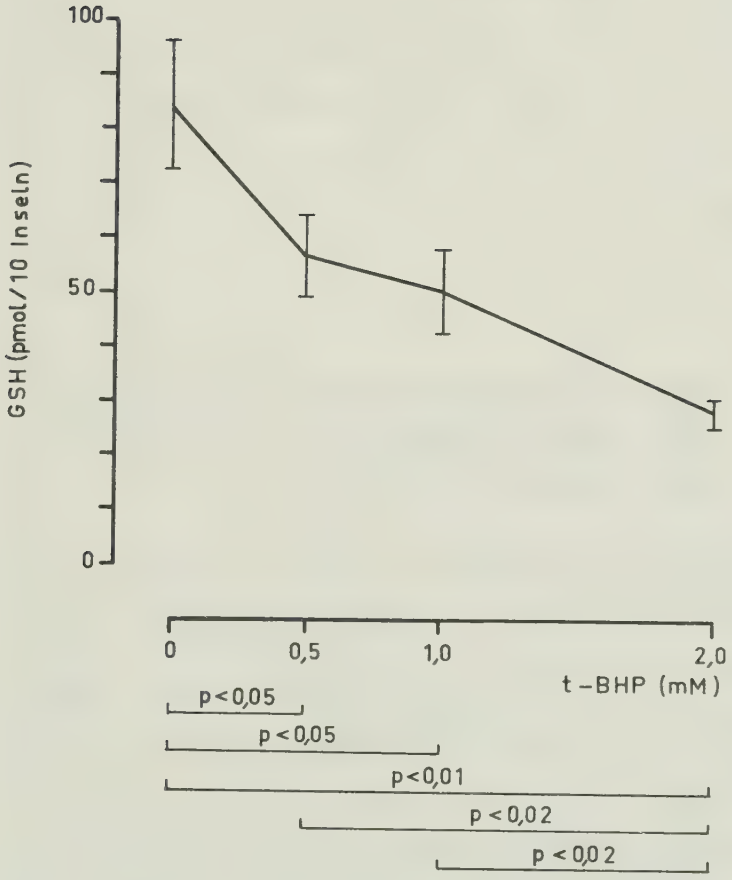


Abb. 31: Einfluß von t-BHP auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche (n = 19-35).

eine rasche, selektive und dosisabhängige Oxidation des GSH erreicht werden. Zwischen O und O,5 mM t-BHP war ein signifikanter Anstieg des GSSG zu beobachten; dieser vergrößerte sich bei Erhöhung der t-BHP-Konzentration nicht mehr (Abb. 32). Wurde der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient berechnet, so zeigte sich eine von der t-BHP-Konzentration abhängige Abnahme (Abb. 33).

4.5 Einfluß von Diamid auf den GSH-, GSSG-Gehalt und den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln, gemessen unter Verwendung der OPT-Methode

Mit dem Oxidationsmittel Diamid konnte in Konzentrationen von O,1; O,5; 1,O mmol/l eine signifikante dosisabhängige Abnahme des GSH-Gehaltes nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose beobachtet werden. Damit verbunden war ein Anstieg des GSSG, der jedoch nicht so stark ausgeprägt war wie die Zunahme des GSH, und eine Abnahme des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten (siehe Abb. 34-36 und Tab. 26).

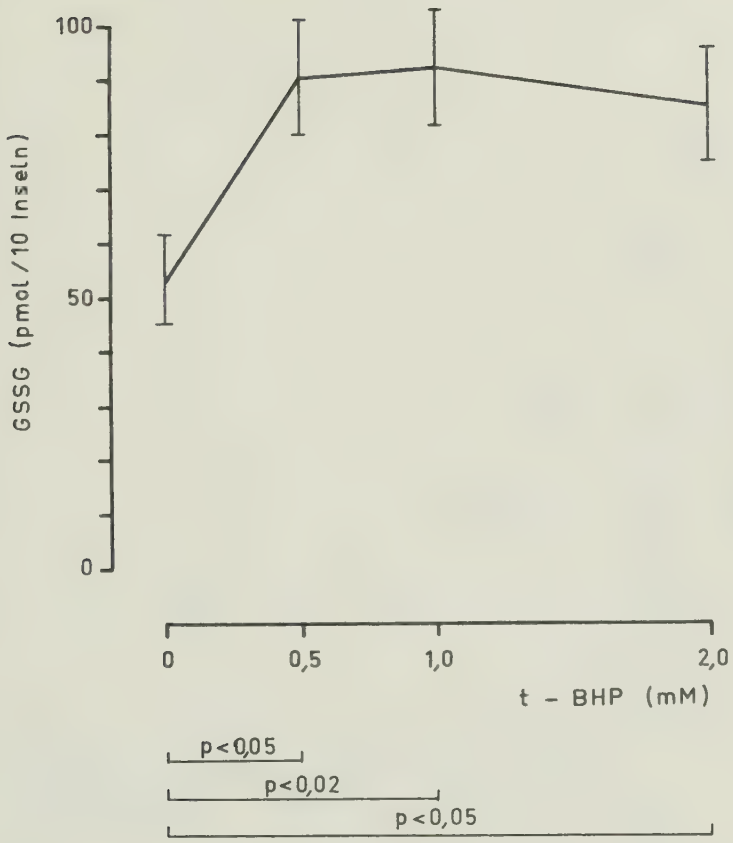


Abb. 32: Einfluß von t-BHP auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche (n = 16-28). Der GSSG-Gehalt wurde als pmol GSH berechnet (1 pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

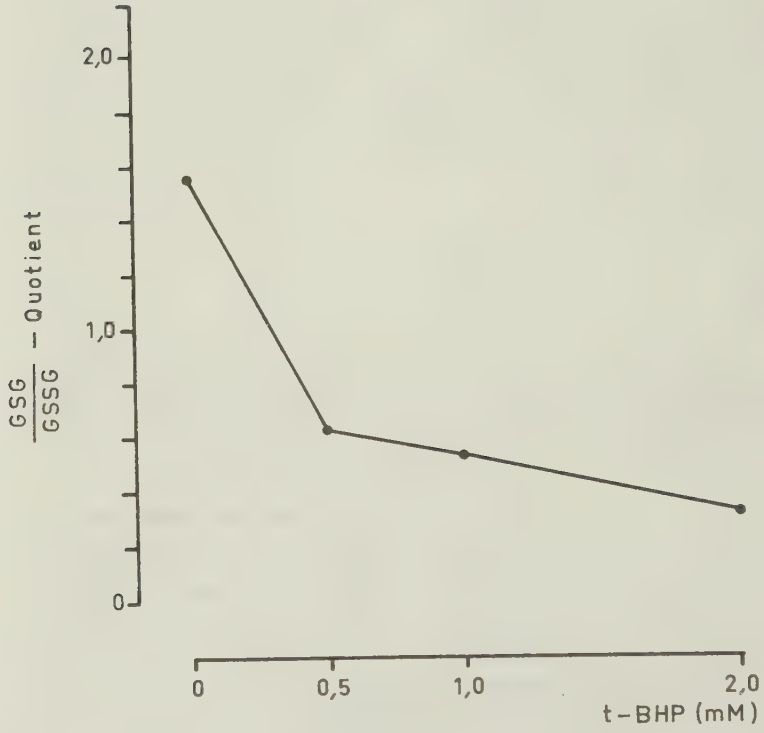


Abb. 33: Einfluß von t-BHP auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden Tab. 25 entnommen.

Tabelle 26: Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an Diamid auf den Gehalt an GSH, GSSG und den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln von Ratten nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von Glucose (3 mg/ml). Die GSH- und GSSG-Bestimmungen erfolgten nach der unter 3.1.2.5 beschriebenen OPT-Methode.

Parameter	Diamid-Konzentrationen (mM)			
	0	0,1	0,5	1,0
GSH pmol ± SEM /10 Inseln	85,0 ± 6,5 (26) A	45,1 ± 4,5 (38) B	38,6 ± 6,5 (35) C	19,5 ± 4,2 (38) D
GSSG pmol ± SEM /10 Inseln	19,8 ± 2,2 (21) E	24,9 ± 1,6 (34) F	26,0 ± 2,2 (33) G	29,5 ± 2,0 (38) H
$\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten	2,1	0,89	0,72	0,33

Anzahl der Versuche (n) in Klammern

Statistische Auswertung: AB: P <0,001 BC: n.s. EF: n.s.
AC: P <0,001 BD: P <0,001 EG: n.s.
AD: P <0,001 CD: P <0,02 EH: P <0,01

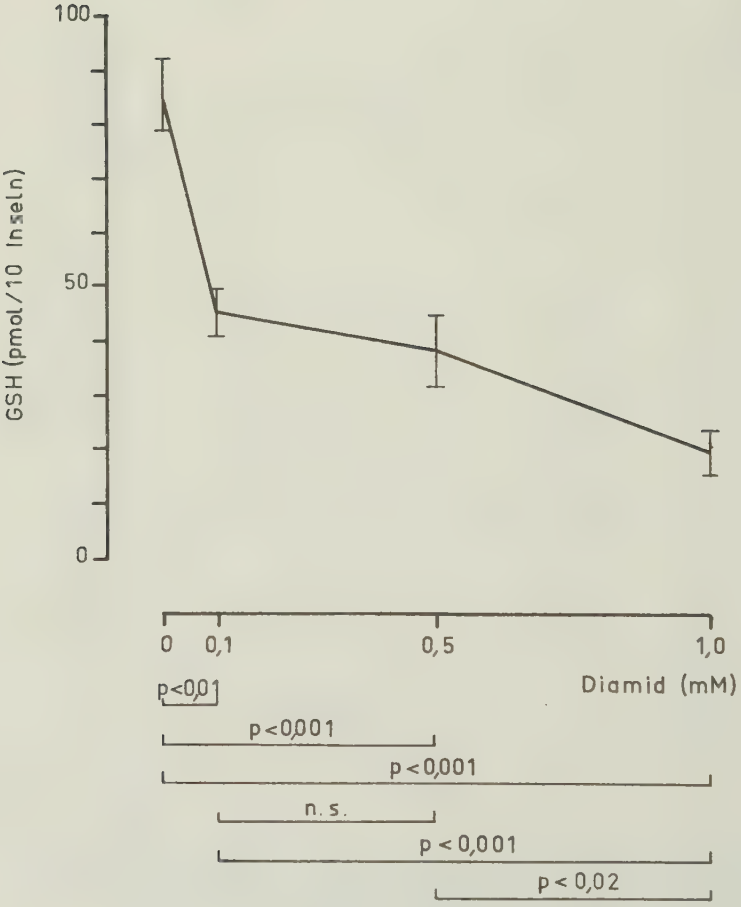


Abb. 34: Einfluß von Diamid auf den GSH-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche (n = 26-38).

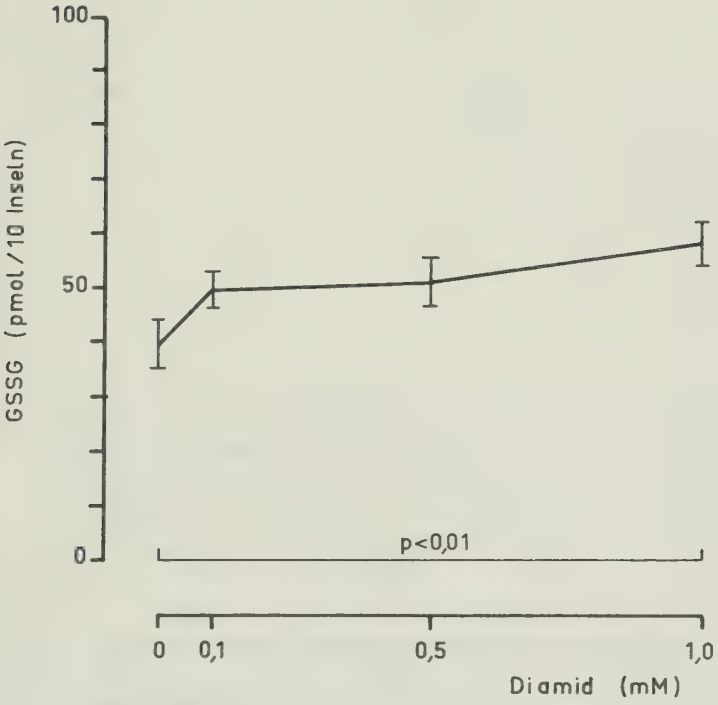


Abb. 35: Einfluß von Diamid auf den GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Mittelwerte ± SEM, Anzahl der Versuche (n = 21-38). Der GSSG-Gehalt wurde als pmol GSH berechnet (1 pmol GSSG ≙ 2 pmol GSH).

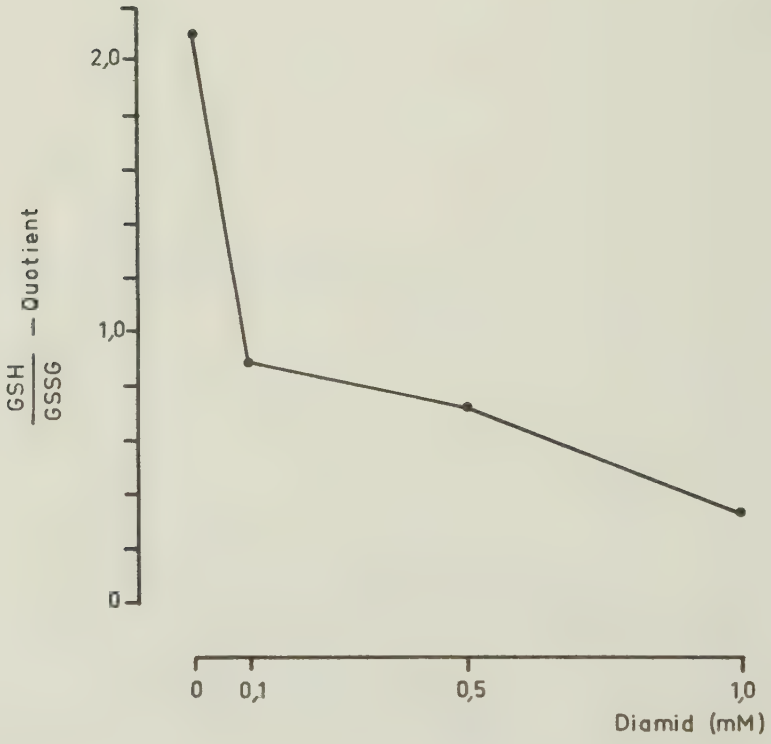


Abb. 36: Einfluß von Diamid auf den GSH/GSSG-Quotienten Langerhansscher Inseln der Ratte nach 15-minütiger Inkubation in Gegenwart von 3 mg/ml Glucose. Die Mittelwerte zur Berechnung der Quotienten wurden Tab. 26 entnommen.

4.6 Beziehungen zwischen den $\frac{NADPH}{NADP}$ - und $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten unter Glucoseeinfluß

In der Abb. 37 wurde der unter dem Einfluß von Glucose bestimmte $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient (vgl. Tab. 21 und Abb. 26) mit dem von Ammon et al. (34) bestimmten $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten korreliert. Dabei zeigte sich, daß eine enge Korrelation zwischen der Zunahme der Quotienten von $\frac{GSH}{GSSG}$ und $\frac{NADPH}{NADP}$ bei 15-minütiger Inkubation mit Glucose besteht.

4.7 Beziehung zwischen der durch Diamid hervorgerufenen Senkung des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten und der durch diese Substanz hervorgerufenen Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion

Abb. 38 zeigt die Korrelation zwischen der Abnahme des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten und der Hemmung der Insulinsekretion durch Diamid in verschiedenen Konzentrationen. Die Werte für den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten sind der Tabelle 21 entnommen, die Werte für die Insulinsekretion entstammen den Arbeiten von Ammon et al. (37, 105). Auch hier zeigte sich eine enge Korrelation.

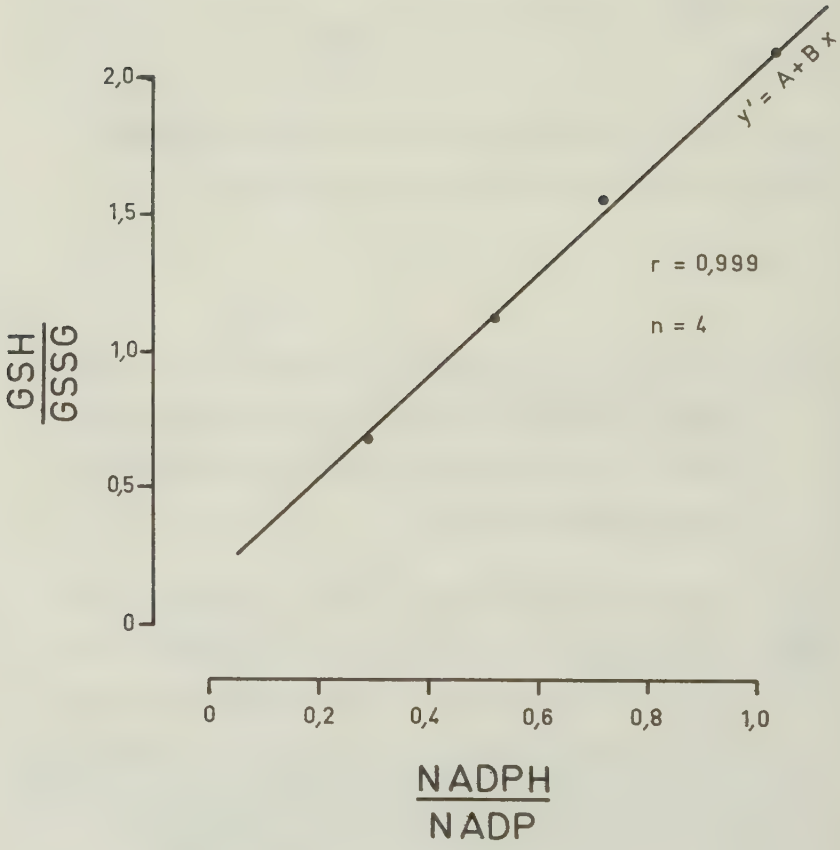


Abb. 37: Korrelation zwischen der Zunahme des GSH/GSSG- und des NADPH/NADP-Quotienten nach 15-minütiger Inkubation mit verschiedenen Glucose-Konzentrationen (0; 1; 2 und 3 mg/ml Glucose). Die Werte für den GSH/GSSG-Quotienten entstammen der Tab. 21, die Werte für den NADPH/NADP-Quotienten entstammen der Arbeit von Ammon et al. (34).

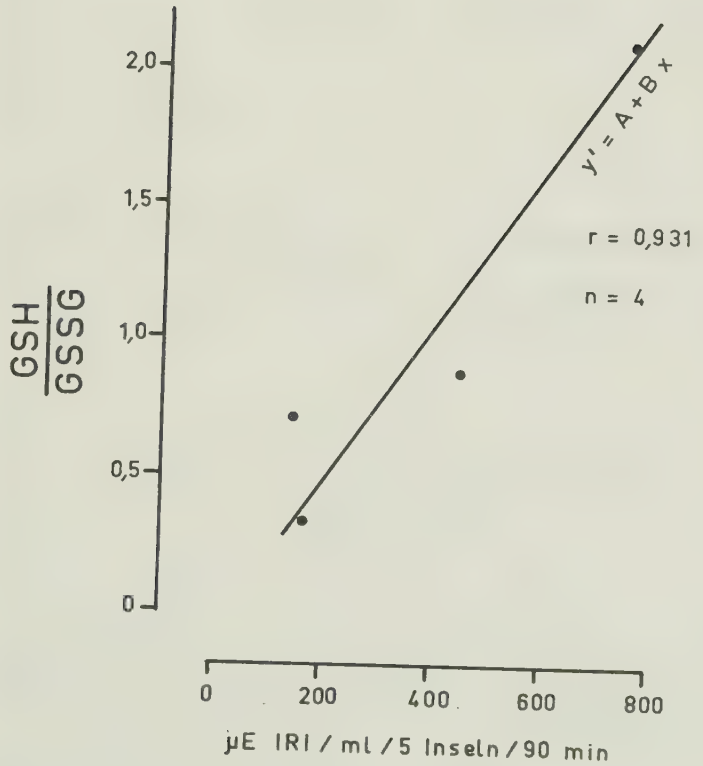


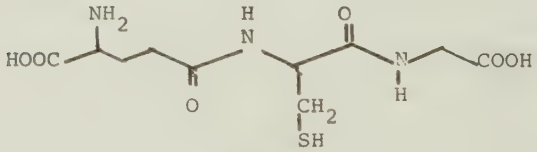
Abb. 38: Korrelation zwischen der Abnahme des GSH/GSSG-Quotienten und der Hemmung der Insulinsekretion Langerhansscher Inseln von Ratten durch verschiedene Konzentrationen an Diamid. Die GSH/GSSG-Werte entstammen der Tabelle 21, die Werte für die Insulinsekretion der Arbeit von Ammon et al. (37).

5. DISKUSSION

5.1 Stellung von Glutathion im Zellstoffwechsel

Glutathion, von Hopkins 1921 isoliert (76), ist ein Tripeptid der Zusammensetzung L-γ-Glutamyl-L-cysteinyl-L-Glycin. Es kommt in fast allen lebenden Zellen in Konzentrationen zwischen 0,5 und 10 mM vor. Strukturell weist es zwei Besonderheiten auf:

1. der γ-Glutamylrest schützt Glutathion vor dem Angriff der meisten Peptidasen und ermöglicht spezifische Glutamyltransferreaktionen.



2. Die SH-Gruppe befähigt Glutathion zur Beteiligung an Redoxreaktionen. Bei Oxidation geht es in das Disulfid GSSG über.

Die Biosynthese erfolgt intrazellulär in zwei enzymatischen Schritten aus L-Glutamat, L-Cystein und L-Glycin in Gegenwart von ATP und Mg^{2+} (77).

Durch Oxidation entstehendes GSSG wird laufend wieder enzymatisch reduziert, um einen bestimmten GSH/GSSG-Quotienten (von Kosower als Glutathion-Status definiert (40)) auf-

rechtzuerhalten.

Diese Reaktion wird durch das Enzym Glutathionreduktase (GR),einem Flavoprotein, wie folgt katalysiert: (78)

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2\ GSH + NADP^+$$

Die SH-Gruppe des Glutathions ist an folgenden Reaktionen beteiligt:

a) allgemeine Reaktionen

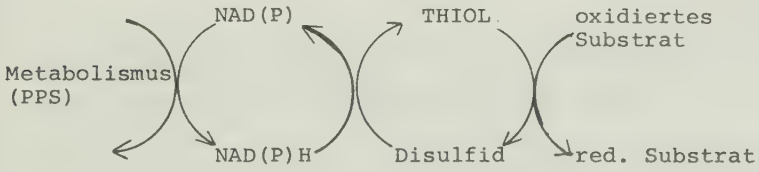
Zwischen einem Thiol (R-SH) und einem Disulfid (X-S-S-X) sind ganz allgemein folgende Reaktionen möglich:

$$RSH + XSSX \longleftrightarrow RSSX + XSH$$

$$RSH + RSSX \longleftrightarrow RSSR + XSH$$

Diese Reaktionen sind pH-abhängig (79).

Im Zellstoffwechsel ist der Redoxstatus des Thiol-Disulfidsystems eng mit dem Metabolismus verknüpft und zwar nach folgendem Schema (65):



b) GSH und Membran-Protein-SH

Viele Stoffwechselschritte in der Zelle sind außerordentlich stark vom Thiol-Disulfidstatus der Zelle abhängig

bzw. werden von ihm kontrolliert (65). Besonders die Funktionen und Eigenschaften von Membranen und die Aktivität vieler Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels können über die Bildung von gemischten Disulfiden mit niedermolekularen Thiolen (GSH) beeinflußt werden (kovalente Enzymregulation)(62,80).

Dem Glutathion, das den Hauptanteil des Thiol-pools in der Zelle ausmacht, kommt dabei besondere Bedeutung zu. So wird das Gleichgewicht zwischen GSH und gemischten Disulfiden durch Enzyme aufrechterhalten, die Thiol-Transferaseaktivität besitzen. Die GSSG-Konzentration wird wiederum durch die Enzyme GR und POD kontrolliert (siehe Abb. 39). Folgendes Schema zeigt ein Modell für die Verknüpfung von GSH und GSSG mit gemischten Disulfiden im Thiol-Disulfidsystem unter Beteiligung der Enzyme Thiol-Transferase, Glutathion-Reduktase und des NADPH-bildenden Enzyms G-6-P-Dehydrogenase, dem Schlüsselenzym des PPS (81).

Eine Beeinflussung dieses Systems durch Verändern des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten hat veränderte Membraneigenschaften zur Folge.

Folgende Membranfunktionen können, je nach Redoxzustand des oben genannten Systems, gefördert oder gehemmt werden:

1. Regulation des Transports von Hexosen durch Insulin (82),
2. Transport von Ionen durch Membranen (83),
3. Freisetzung lysosomaler Enzyme (84),
4. Funktion von Mitochondrienmembranen (85),
5. Verhalten des cornealen Endotheliums (86).

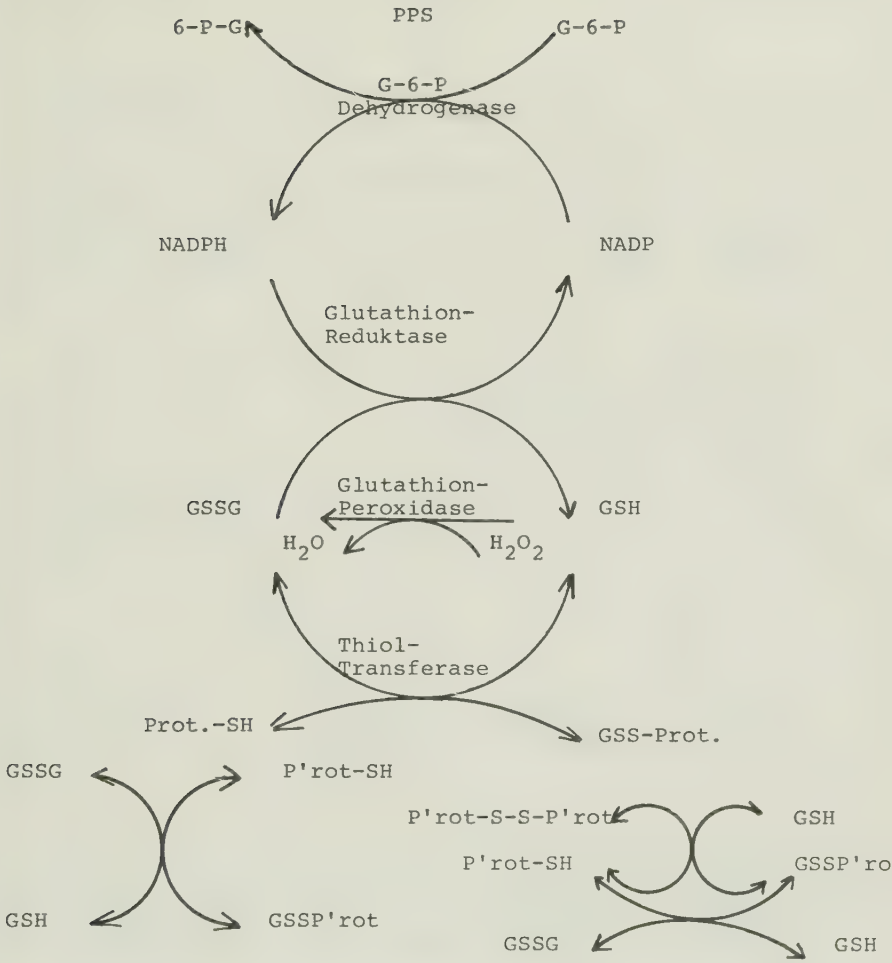


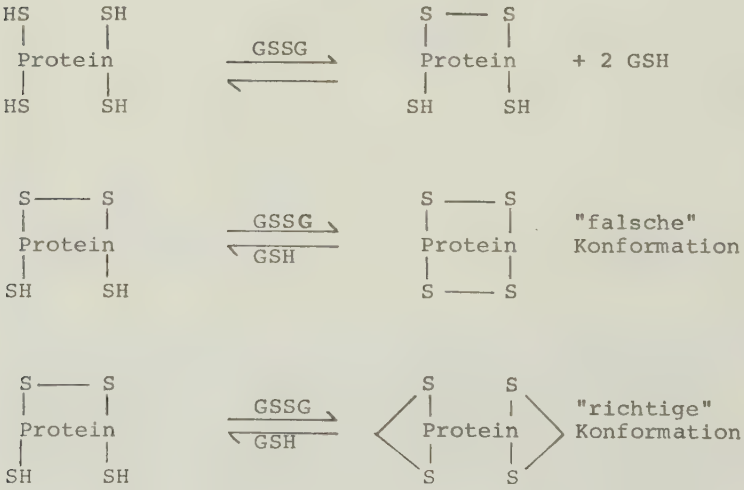
Abb. 39: Beziehungen zwischen GSH, GSSG, gemischten Disulfiden mit Membran- oder Enzym-Proteinen und dem NADPH-bildenden System im Zellstoffwechsel (nach Isaac 1977).
Prot.-SH: Protein SH-Gruppen, die unter physiologischen Bedingungen gemischte Disulfide bilden können und möglicherweise im Metabolismus regulatorische Funktion ausüben.
P'rot-SH: Protein-SH-Gruppen, die für enzymatische oder strukturelle Aufgaben in Membranen benötigt werden und die unter physiologischen Bedingungen keine gemischten Disulfide bilden.
P'rot-S-S-P'rot: Protein-Disulfide, die ebenfalls für enzymatische oder strukturelle Aufgaben benötigt werden, aber unter physiologischen Bedingungen keine gemischten Disulfide bilden.

c) GSH und Enzym-Protein-SH

Eine weitere Aufgabe des Redoxstatus von Glutathion besteht darin, die Aktivität von solchen Enzymen zu modulieren, deren Aktivität von SH-bzw. SS-Gruppen abhängt. Von Kosower et al. wurde ein Modell postuliert, wie durch Thiol-Disulfid-Austauschreaktion die Aktivität eines Enzyms reguliert werden kann (80).

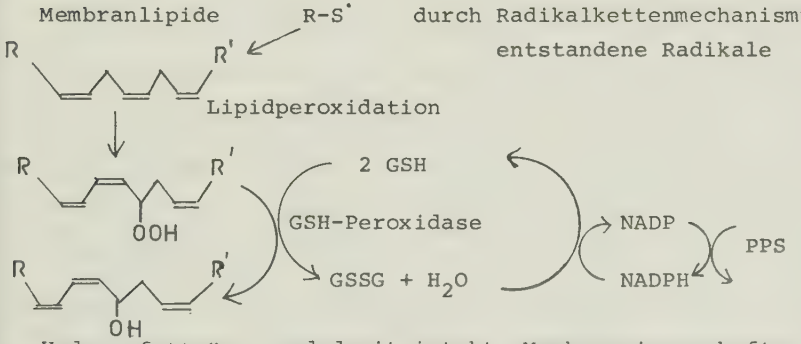
Folgender Reaktionsablauf ist denkbar:

Ein in der inaktiven Konformation vorliegendes Enzym könnte durch Thiol-Disulfidaustausch mit Glutathion in die aktive, "richtige" Konformation gebracht werden.



Glutathion-Peroxidase (POD)

Die physiologische Aufgabe der POD ist es wahrscheinlich, intrazellulär anfallendes H_2O_2 und durch Lipidperoxidation entstandene Lipidperoxide nach folgendem Schema zu reduzieren (87):



Hydroxyfettsäure und damit intakte Membraneigenschaften.

Bemerkenswert ist dabei die hohe Spezifität des Enzyms für das Donorsubstrat GSH und die geringe Spezifität für das Akzeptorsubstrat, weshalb angenommen werden kann, daß intrazellulär nur GSH oxidiert wird und andere Thiole wie Cystein nicht umgesetzt werden (88).

In der vorliegenden Arbeit wurde dem Enzym das Akzeptorsubstrat t-BHP angeboten (wie später noch zu diskutieren ist, siehe Seite156), das, wie aus Untersuchungen von Little und O-Brien (89) bekannt ist, nach dem auf Seite 157 beschriebenen Reaktionsablauf umgesetzt wird.

Glutathion und Aminosäuren-Transport via γ-Glutamylzyklus

Von Meister et al. wird dem Glutathion eine wichtige Rolle innerhalb eines Aminosäuren-Transportsystems, dem γ-Glutamylzyklus zugesprochen. Abb. 40 zeigt den von Meister et al. postulierten Reaktionsablauf (90).
Das membrangebundene Enzym γ-Glutamyltranspeptidase reagiert mit einer Aminosäure außen an der Membran und innen mit der γ-Glutamylgruppe des GSH. Auf noch ungeklärte Weise wird die Aminosäure in die Zelle geschleust und als γ-Glutamyl-Aminosäure im Cytosol freigesetzt. Das verbleibende Dipeptid wird durch Peptidasen abgebaut und stellt wieder L-Cystein und L-Glycin für die GSH-Neusynthese bereit. Das Enzym Glutamylcyclotransferase (E.C.2.3.2.4.) katalysiert die Abspaltung der eingeschleusten Aminosäure und gleichzeitig die Cyclisierung des γ-Glutamylrestes zu 5-Oxoprolin. Sinnvoll wird der Kreis geschlossen, indem das entstandene 5-Oxoprolin nicht kumuliert, sondern durch 5-Oxoprolinase unter ATP-Verbrauch zu Glutaminsäure gespalten wird, die wieder in die GSH-Synthese eingeht.

GSH und Insulin-abbauende Enzyme der β-Zelle

Aus der β-Zelle konnten nicht nur Insulin-synthetisierende (91), sondern auch Insulin-abbauende Enzyme isoliert werden (92).
Es kann als gesichert gelten, daß in der β-Zelle nicht nur die Abspaltung des C-Peptids aus Proinsulin enzymatisch katalysiert wird, sondern auch die Inaktivierung des Insulins

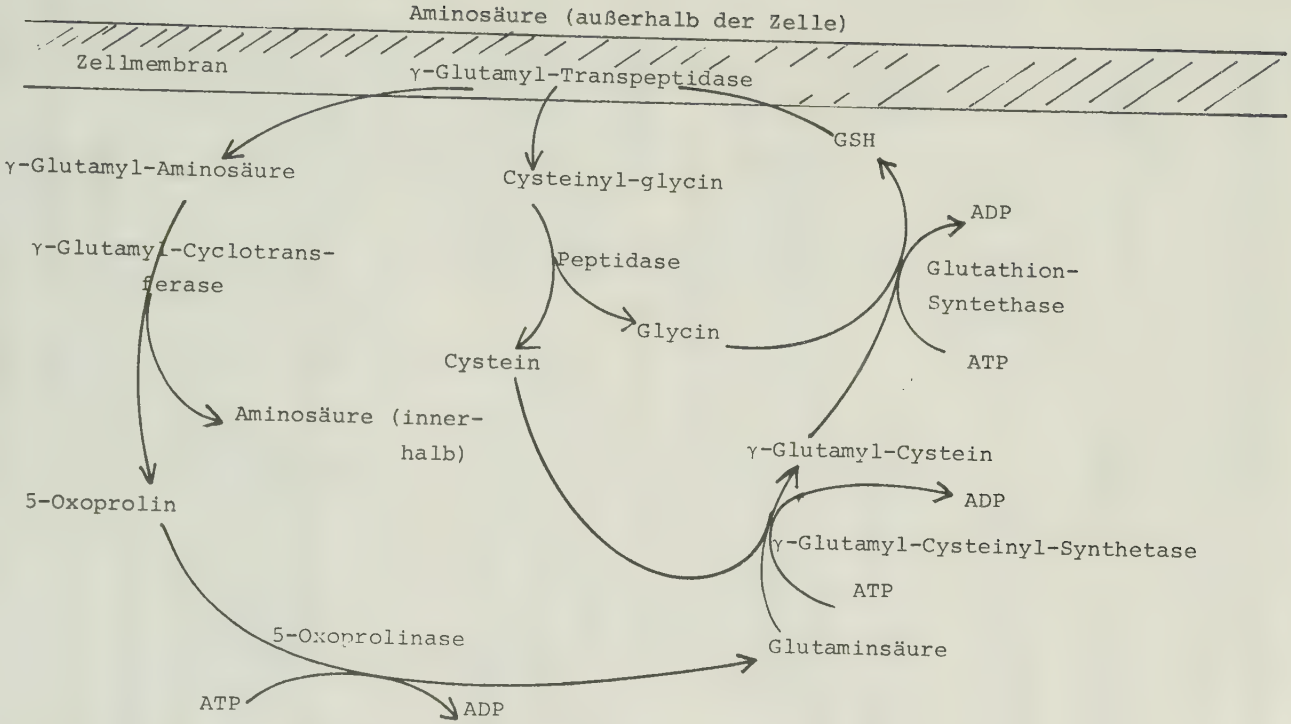


Abb. 40: Transport einer Aminosäure vom Extrazellulärraum ins Zellinnere über den γ-Glutamyl-Zyklus. Einzelheiten zum Reaktionsablauf finden sich im Text.

durch Spaltung der Disulfidbrücken. Das Enzym, das die Disulfid-Reduktion katalysiert, wurde als eine Glutathion: Protein-disulfid Oxidoreduktase identifiziert, deren Aktivität in der Mikrosomenfraktion durch GSH stimulierbar ist (93).
Möglicherweise liegt hier ein weiterer Verknüpfungspunkt zwischen GSH und dem Sekretionsapparat der Inselzelle.

GSH und Konjugationsreaktionen

Eine wichtige Rolle spielt GSH auch bei der Entgiftung von toxischen Substanzen. Es wurden bereits eine Reihe von GSH-S-Transferasen charakterisiert, die nach ihren Substraten in unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Gemeinsam katalysieren sie den ersten Schritt der Mercaptursäuresynthese (94,95).
Eine Zusammenstellung der wichtigsten GSH- und GSSG-abhängigen enzymatischen Reaktionen zeigt Tabelle 27.

5.2 Konzentration von GSH und anderen SH-Verbindungen in Geweben

Einen Einblick in die quantitativen Verhältnisse hinsichtlich GSH und anderer SH-Verbindungen sollen folgende Befunde geben, z.B. enthält Leberhomogenat Protein-SH 28 µmol/g Protein und als nicht-Protein-SH nur 12 µmol/g Protein (97). Von diesen nicht-Protein-SH-Gruppen macht GSH den Hauptan-

Tabelle 27

Übersicht einiger wichtiger Enzyme, die GSH bzw. GSSG abhängige Reaktionen katalysieren (96)

I.	Biosynthese		
	Enzym: Glutamat: Cystein γ-Ligase (Synthetase I)	Produkt:	γ-Glutamylcystein
	γ-Glutamylcystein: Glycin Ligase (Synthetase II)		GSH
II.	Abbau		
	Enzym: γ-Glutamyl-Transpeptidase	Produkt:	γ-Glutamylaminosäure; Cysteinylglycin
	γ-Glutamyl Cyclo-transferase		5-Oxoprolin; Aminosäure
	5-Oxoprolinase		Glutamat
	Cysteinylglycinase		Cystein; Glycin
III.	Reduktion		
	Enzym: Glutathion Disulfid Reduktase	Produkt:	GSH
IV.	Oxidation		
	Enzym: Glutathion Peroxidase	Produkt:	GSSG, HOH oder ROH
V.	Konjugation		
	Enzym: Glutathion S-Trans-ferasen	Produkt:	GS-Derivate
VI.	Austauschrekationen		
	Enzym: Thiol-Disulfid	Produkt:	RSH, GSSG
VII.	Beteiligung von GSH ohne Änderung des Oxidationszustandes		
	Enzym: Glyoxalasen (I,II)	Produkt:	D-Laktat; D-3-Phosphoglycerat
	Isomerasen, z.B. Maleoylacetoacetoacetat Isomerase		trans-Verbindungen
	Formaldehyd Dehydrogenase		S-Formyl GSH
	S-Formyl Glutathion Hydrolase		
	Dopamin-β-Hydroxylase		

teil aus. Zum Vergleich mit der Aminosäure Cystein seien folgende Zahlen genannt:

	Thiol	Disulfid	gesamt
Glutathion	500 - 10 000	25 - 500	500 - 10 000
Cystein	30 - 100	3 - 20	30 - 120

in nmol/g Gewebe (feucht) (65).

Tabelle 28: Konzentrationen von Glutathion und Cystein in Säugetiergeweben und die Quantität ihres Vorkommens in reduzierter bzw. oxidierter Form.

Aus Tabelle 28 ist ersichtlich, daß Glutathion etwa 100-fach konzentrierter vorkommt als z.B. Cystein, wobei beide fast ausschließlich in der reduzierten Form als Thiol vorliegen. Wie Isaac et al. zeigen konnten, liegen auch die SH-Gruppen von Proteinen vorwiegend in der reduzierten Form als Protein-SH vor. Außerdem konnte festgestellt werden, daß ein Teil des Glutathions in der Form von Protein-S-S-G an Protein gebunden vorkommt.

Für das Thiol-Disulfid-Verhältnis ermittelten Isaac et al. im Leberhomogenat folgende Werte:

Prot.-SS-Prot.	37,6 nmol/mg Protein
Prot.-SH	63,6 nmol/mg Protein
$\frac{\text{Prot.-S-S-Prot.}}{\text{Prot.-SH}}$	0,59
GSS-Prot.	10,4 nmol/mg Protein
GSH	20,4 nmol/mg Protein
$\frac{\text{GSS-Prot.}}{\text{GSH}}$	0,51

Tabelle 29: Konzentration an Protein-Thiol, Protein-Disulfid, GSH und gemischten Disulfiden des GSH mit Protein-SH-Gruppen (81).

Aus Tabelle 29 geht hervor, daß etwa doppelt soviel Glutathion in der Thiol-Form im Leberhomogenat vorliegt wie in der Form des gemischten Disulfids. Das Verhältnis Thiol zu gemischtem Disulfid ist in etwa das gleiche wie das von Protein-Thiol zu Protein-Disulfid.

Hinsichtlich des Gehalts an GSH, GSSG sowie des daraus zu berechnenden $\frac{\text{GSH}}{\text{GSSG}}$ - Quotienten finden sich in der Literatur verschiedene Angaben bei den einzelnen Geweben und Spezies.

GSH in µg/g	GSSG in µg/g	GSSG in % Ges.-Glut.	GSH / GSSG	Referenz
Rattenleber:				
2180	0			(98)
1695	0			(99)
1930	78	4 %		(56)
	21			(100)
1753	288	14 %	6,0	(60)
Rattenniere:				
875	0			(98)
764	38	4,7 %		(56)
Rattenmilz:				
921				(65)
Rattenblut:				
322-340 µg/ml				(56)
399				(65)
Harding-Passey Melanom:				
452	86	16 %	5,2	(54)
Brustdrüsen von Mäusen:				
326	157	32 %	2,1	(60)
menschl. Brustdrüsen:				
83	32	27 %	2,6	(60)

Tabelle 30: Gehalt von GSH und GSSG verschiedener Gewebe nach Angaben mehrerer Autoren.

Wie aus Tabelle 30 hervorgeht, differieren die Angaben über die Konzentrationen an GSH und GSSG beträchtlich je nach Art des Gewebes, Spezies und Versuchsbedingungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter Anwendung der vorne beschriebenen modifizierten Mikromethoden (enzymatic cycling siehe 3.1.1.3 und OPT-Fluoreszenzmessung siehe 3.1.2) folgende Werte für Gesamtglutathion, GSH und GSSG in Leber, Niere, Milz und Vollblut der Ratte gefunden:

Gewebe	Gesamt-glutathion	GSH µg/g	GSSG µg/g	GSSG in %	verwendete Methode
Leber	1710				enzymatic cycling
		1700	400	19 %	OPT
Niere			49,7		OPT
Milz	518				OPT
Vollblut	280 µg/ml				enzymatic cycling

Tabelle 31: Gehalt an Gesamtglutathion, GSH und GSSG in verschiedenen Organen der Ratte, bestimmt mit den von uns modifizierten Mikromethoden (enzymatic cycling und OPT-Methode).

Wie die Tabelle 30 zeigt, unterscheiden sich die Anteile von GSSG am Gesamtglutathion beträchtlich zwischen den Organen. So scheinen in der Leber, Niere und Erythrocyten die GSSG-Konzentrationen am niedrigsten zu sein, von eini-

gen Autoren wird überhaupt kein GSSG gefunden. Es handelt sich hier allerdings um ältere Arbeiten, bei jüngeren Untersuchungen ergab sich ein Anteil bis zu 14 %.
In unseren Untersuchungen (Tab. 31) fanden wir für die Leber 19 %. Auffällig ist, daß bei dem einzigen untersuchten Drüsengewebe, der Milchdrüse, ein relativ hoher Anteil von GSSG, nämlich im Bereich von 30 % des gesamten Glutathions, gefunden wurde. Bei unseren Untersuchungen an Inselgewebe stellte sich heraus, daß für GSSG dann, wenn die Inseln in einem Medium inkubiert wurden, das Glucose in einer Konzentration enthält, die etwa der des normalen Blutzuckerspiegels entsprach, ebenfalls ein Anteil in Höhe von ca. 59 % zu finden ist.
Die absoluten Werte an GSH plus GSSG, bezogen auf das geschätzte mittlere Inselgewicht von ca. 5 µg/Insel sind etwa 360 µg/g. Präzisere Angaben sind zur Zeit allerdings nicht möglich, weil die genaue Inselmasse wegen der geringen Gewebsmenge nicht exakt zu bestimmen ist. Nach Angaben von Falkmer et al. (101) beträgt das Gewicht einer Insel 2-10 µg. Unter dieser Annahme wäre die von uns gefundene Menge an Gesamtglutathion in der gleichen Größenordnung wie die anderer Organe (Tab. 30).
Auf den ersten Blick erscheint der GSSG-Anteil am Gesamtglutathion, verglichen mit dem anderer Organe, relativ hoch. Dies könnte unter Umständen methodisch bedingt sein. Gegen eine solche Annahme spricht jedoch, daß wir mit der von uns angewandten Methode in der Leber und Niere (vgl. Tab. 31) ähnliche Werte finden, wie sie von anderen Auto-

ren angegeben werden. Man könnte hinsichtlich der relativ hohen GSSG-Werte auch argumentieren, daß bezüglich der Zeit, die zwischen dem Töten des Versuchstieres und der Denaturierung der Inseln zum Zweck der Glutathion-Bestimmung vergangen ist, vorhandenes GSH in GSSG übergeführt wurde. Dem steht entgegen, daß wir bei der gesamten experimentellen Prozedur, beginnend bei der Collagenaseisolierung über die Trennvorgänge bis hin zur eigentlichen Inkubation (3.2.1 - 3.2.4) immer in Gegenwart von 1 mg/ml Glucose gearbeitet haben, so daß für die Bildung von GSH jederzeit genügend Substrat zur Verfügung gestanden hat. Darüber hinaus wurde die Inkubation in einem glucosehaltigen Medium unter Zufuhr von Carbogen durchgeführt, wodurch ebenfalls optimale Bedingungen zur Bildung von reduziertem Glutathion vorlagen. Das sollte ausreichen, um eine vollständige Regeneration des GSH, falls dieses durch den Isolierungsprozeß in GSSG übergegangen sein sollte, zu gewährleisten. Für diese Annahme sprechen auch Befunde von Kosower et al., die an Erythrozyten zeigen konnten,daß nach vollständiger Oxidation des GSH durch Diamid und anschließendem Entfernen des Diamid und Zufuhr von Glucose GSH innerhalb von 30 min zu 80 - 90 % regeneriert wurde (40).

5.3 Einfluß von Glucose auf den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten der β-Zelle

Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Glucosekonzentrationen auf den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten sind unseres Wissens an keinem Organ durchgeführt worden. Es wurde einleitend darauf hingewiesen, daß insbesondere solchen Stoffwechselvorgängen in der β-Zelle eine Bedeutung bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion zukommt, deren Ausmaß von der Glucose abhängt.
Eine solche Abhängigkeit wurde gefunden für

1. Glucoseutilisation (17)
2. Glykolyse (102)
3. Glucoseoxidation (102)
4. PPS (35)
5. $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotient (34)

Wie die Abb. 26a) zeigt, ist auch der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient bei 15 min Inkubation von Pankreasinseln abhängig von der Glucosekonzentration. Dies weist auf die Möglichkeit hin, daß auch der Redoxzustand des GSH eine Bedeutung im Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion haben könnte.

Es wurde bereits darauf hingewiesen (Seite[136]), daß im allgemeinen in den Geweben eine enge Beziehung zwischen dem NADPH-NADP-System und dem Redoxzustand des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Verhältnisses besteht, und daß als wesentlicher H^+-Donator zur Reduktion von NADP der Glucosemetabolismus über den PPS anzusehen ist. Da sowohl der PPS als auch der $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotient

abhängig von der Glucosekonzentration zunehmen, liegt der Schluß nahe, daß in der Pankreasinsel eine enge Beziehung zwischen der Zunahme des $\frac{GSH}{GSSG}$ - und der des $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten sowie der Aktivität des PPS vorhanden ist. Berechnet man eine Korrelation zwischen der Höhe des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten und der des $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten (letzterer wurde unter den gleichen Bedingungen ermittelt wie der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient in dieser Arbeit) bei zunehmender Glucosekonzentration, so ergibt sich mit einem Koeffizienten von r = 0,999 eine äußerst enge Korrelation, die darauf hinweist, daß unter vergleichbaren Versuchsbedingungen auch in der Pankreasinsel der Redoxzustand des $\frac{GSH}{GSSG}$ von dem des $\frac{NADPH}{NADP}$ abhängt.

Eine Abhängigkeit des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten von der Glucosekonzentration scheint auf den ersten Blick allerdings nicht vorzuliegen, wenn die Inseln anstatt 15 min 90 min inkubiert werden, da der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient zwischen 1 mg/ml und 3 mg/ml Glucose nicht mehr zunimmt. Dies läßt sich jedoch aufgrund der besonderen experimentellen Bedingungen leicht erklären. Wie kürzlich berichtet (38), hemmt Insulin, das sich infolge Sekretion im Inkubationsmedium befindet, den PPS Langerhansscher Inseln und senkt den $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten (die ED_{50} für Insulin liegt dabei zwischen 150 und 200 µE/ml) (38). Damit verbunden dürfte, obwohl dies bisher noch nicht gemessen wurde, eine Senkung des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten einhergehen. Bei der Inkubation mit höheren Glucosekonzentrationen erfolgt eine Stimulierung der Insulin-

sekretion; die insbesondere nach 90 min größere Mengen an Insulin im Inkubationsmedium erwarten läßt.
Inkubiert man lediglich 15 min, so kommt es nach dieser Zeit, selbst bei Anwesenheit von 3 mg/ml Glucose noch nicht zu einer nennenswerten Sekretion von Insulin in das Inkubationsmedium. In der Tat konnte gezeigt werden, daß nach 15 min Inkubation eine von der Glucose abhängige Zunahme des $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten erfolgte (34). Dagegen werden nach 90 min bei Anwesenheit von 3 mg/ml Glucose Insulinkonzentrationen bis zu 1000 µE/ml im Medium gefunden. Von dieser Konzentration, die sich im Verlaufe der Inkubation nach und nach angesammelt hat, muß angenommen werden, daß sie hoch genug ist, den PPS zu hemmen sowie die $\frac{NADPH}{NADP}$ - und $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten zu senken.
In der Tat ist bei 90 min Inkubation auch der $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotient nicht mehr abhängig von der Glucosekonzentration, er steigt zwischen den Konzentrationen O und 1 mg/ml Glucose und nimmt bei weiterer Erhöhung der Glucosedosis nicht mehr zu (34). Da angenommen werden muß, daß der von uns bestimmte $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient jeweils als Momentaufnahme Ausdruck der gerade vorliegenden Stoffwechselsituation ist, die sich von Minute zu Minute ändern kann, dürfte die Tatsache, daß wir bei 90-minütiger Inkubation keine Abhängigkeit des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten von der Glucose-Konzentration finden, schlicht die Folge eines Hemmeffektes des bereits angesammelten Insulins im Medium sein.
Vergleicht man unsere Versuche mit der Situation in vivo, so kommt die Inkubation über 15 min diesen Bedingungen in-

sofern nahe, als in vivo freigesetztes Insulin laufend durch die Blutzirkulation abtransportiert wird und somit unter normalen Bedingungen (mit Ausnahme vielleicht bei maxim. Stimulation) nicht auf den Stoffwechsel der ß-Zelle zurückwirkt.

Die Beobachtung, daß nach 90 min Inkubation mit 2 mg/ml, 3 mg/ml und 4 mg/ml Glucose ein Anstieg des Gesamtglutathion erfolgte, läßt auf eine gesteigerte Biosynthese schließen. Die Biosynthese des Glutathion erfolgt in 2 enzymatischen Reaktionen, die beide ATP- und Mg^{2+}-abhängig sind. Denkbar wäre, daß durch erhöhtes Substratangebot ein ATP-Anstieg erfolgt und dadurch auch die Biosyntheserate des Glutathion gesteigert wird (103).

Die Tatsache allein, daß der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient von der Glucose abhängig ist, liefert noch keine ausreichende Begründung dafür, daß diesem Quotienten eine Bedeutung im Mechanismus der Insulinsekretion zukommt. Weitere Hinweise für eine solche Bedeutung können erhalten werden, wenn man diesen Quotienten experimentell senkt und prüft, ob damit eine Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion verbunden ist.
Bereits früher wurde gezeigt, daß eine Senkung des $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten mit einer Verminderung der glucoseinduzierten Insulinsekretion einhergeht (104).
Wenn unsere Hypothese richtig ist, daß der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient in enger Beziehung zum $\frac{NADPH}{NADP}$ - Verhältnis steht, dann müßte

in Gegenwart von Methylenblau der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient abnehmen. Wir haben daher den Einfluß von verschiedenen Konzentrationen an Methylenblau auf den $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten in Anwesenheit von 3 mg/ml Glucose durch Inkubation von 5 Inseln/ml während 15 min Inkubation bestimmt. Zum Methylenblau selbst ist zu sagen, daß es bei Pankreasinseln spezifisch den $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten senkt, ohne daß der $\frac{NADH}{NAD}$ - Quotient, die Glucoseoxidation und der ATP-Gehalt beeinflußt werden (36) und daß seine hemmende Wirkung auf die Insulinsekretion, studiert am isoliert perfundierten Rattenpankreas, reversibel ist (37). (Zum Reaktionsmechanismus zwischen Methylenblau und NADPH siehe Abb. 41). Wie die Abbildung 30 zeigt, findet sich in der Tat eine von der Konzentration des Methylenblau abhängige Senkung des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten. Diese Senkung verläuft parallel zu der von anderen beobachteten Hemmung der Insulinsekretion.

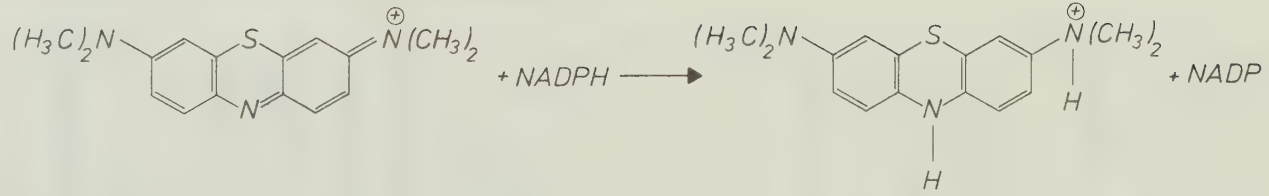
Um die Hypothese weiter zu festigen, daß der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient eine Rolle bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion spielt, wurden 2 weitere Substanzen, Diamid und t-BHP, von denen aus Untersuchungen an anderen Organen bekannt ist, daß sie den Gehalt an GSSG bei gleichzeitiger Verminderung des GSH-Gehaltes erhöhen, zur Anwendung gebracht. Diamid, das bevorzugt niedermolekulare Thiol-Verbindungen oxidiert (62,63), wurde von Kosower et al. dazu benutzt, in Erythrozyten GSH zu oxidieren. Die Geschwindigkeit der Reaktion des Diamids mit GSH ist um ein Vielfaches größer als die mit anderen Thiolverbindungen. Pro-

tein-SH-Gruppen reagieren aus sterischen Gründen fast nicht (40, 96).
Außerdem scheint die Wirkung des Diamids reversibel zu sein, denn in Erythrozyten werden nach 30 min 80 % - 90 % des entstandenen GSSG wieder reduziert, wenn man Diamid aus dem Medium entfernt und die Substratversorgung durch Glucose sicherstellt (40).
Auf den Wirkungsmechanismus des t-BHP, nämlich als Akzeptorsubstrat der POD wurde an anderer Stelle schon hingewiesen (vgl. Seite140). (Zum Reaktionsmechanismus beider "tools" vgl. Seite 157.)
Von beiden Substanzen ist inzwischen nachgewiesen worden, daß sie am perfundierten Rattenpankreas und in isolierten Ratteninseln zu einer reversiblen Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion führen (37,105).

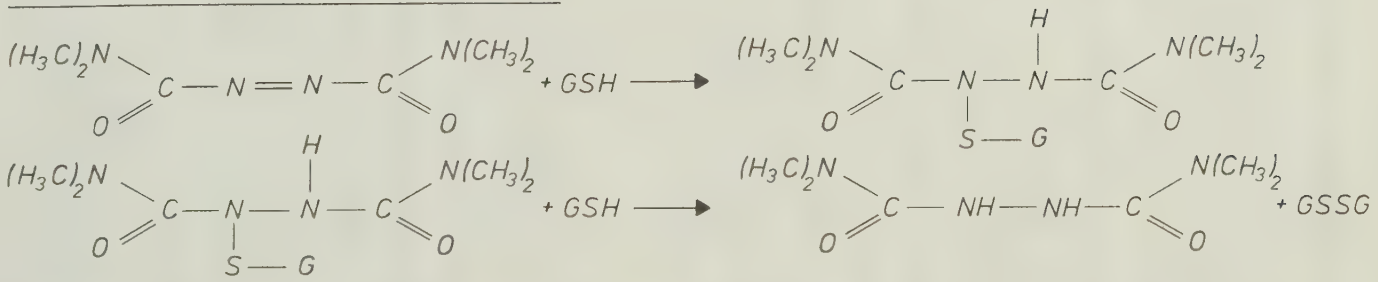
Wie aus den Abb. 33 und 36 hervorgeht, führen beide Substanzen zur Senkung des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten und zwar in einer Konzentration, bei der von anderen eine Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion beobachtet wurde (37). Diese Befunde weisen somit ebenfalls darauf hin, daß der Höhe des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten eine Bedeutung im Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion aus Langerhansschen Inseln zukommt. Ein hoher Quotient läßt eine hohe Sekretion, ein niedriger Quotient eine geringe oder gar keine Sekretion zu.

Es kann die Frage aufgeworfen werden, ob NADPH die Hauptquelle für die Reduktion des GSSG zu GSH ist, oder ob

METHYLENE BLUE AN OXIDANT OF NADPH



DIAMIDE AN OXIDANT OF GSH (-SH)



t-BUTYL HYDROPEROXIDE AN INDIRECT OXIDANT OF GSH

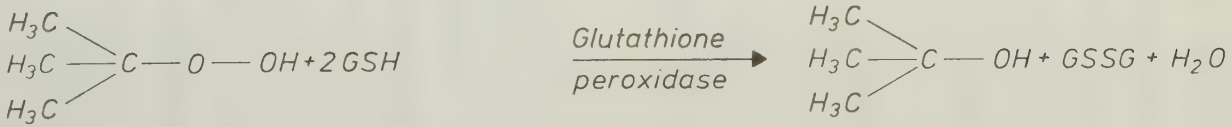


Abb. 41: Reaktionsmechanismus der in der vorliegenden Arbeit zur Oxidation von NADPH und GSH verwendeten

nicht auch dem NADH eine wesentliche Bedeutung zukommt, da von letzterem gezeigt wurde, daß es in vitro zusammen mit Glutathionreduktase, die aus Erythrozyten isoliert wurde, zur Reduktion von GSSG führt (106). Gegen eine mit dem NADPH vergleichbare Bedeutung des NADH spricht allerdings die Tatsache, daß bei Verwendung von Methylenblau eine Senkung des $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten, nicht jedoch des $\frac{NADH}{NAD}$ - Quotienten erfolgte (107), dennoch deutlich eine Senkung des $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten sowie eine Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion zu beobachten war. Obwohl also das NADH-bildende System nicht beeinflußt war, konnte durch dieses offenbar nicht genügend GSSG zu GSH reduziert werden, das ausgereicht hätte, eine Hemmung der Insulinsekretion zu verhindern. Diese Überlegungen stehen in Einklang mit den Befunden an Erythrozyten, bei denen sowohl NADH als auch NADPH zur Reduktion von GSSG herangezogen werden können. Die niederen Michaeliskonstanten für NADPH im Vergleich zu NADH und die Hemmbarkeit der Glutathionreduktase-Reaktion mit NADH durch Salze (108) sprechen jedoch für eine bevorzugte Beteiligung des NADPH als Co-Substrat der Glutathionreduktase-Reaktion (109).

Die Ergebnisse dieser Arbeit, nach denen einerseits der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient mit steigender Glucosekonzentration zunimmt, andererseits die Oxidation von NADPH und GSH eine Senkung des insulären $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotienten bewirkt, die mit einer Hemmung der durch Glucose stimulierbaren Insulinsekretion einhergeht, legen den Schluß nahe, daß diesem Quo-

tienten eine Bedeutung im Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion zukommt.

Durch Korrelation mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen aus diesem Arbeitskreis ergibt sich die Vermutung, daß der $\frac{GSH}{GSSG}$ - Quotient in enger Beziehung zum $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten und zur Aktivität des PPS der Langerhansschen Insel steht, und seine Höhe von diesen Stoffwechselparametern reguliert werden kann.

Zusammenfassung

1. Über die Beteiligung des GSH-GSSG-Systems an der Insulinsekretion liegen bisher keine Untersuchungen vor. Allerdings sprechen eine Reihe von neueren Befunden dafür, daß SH-Gruppen im Mechanismus der Insulinsekretion eine Rolle spielen. Auch dem Pentosephosphatshunt und dem NADPH-NADP-System wird eine Bedeutung für die glucoseinduzierte Insulinsekretion zugeschrieben. Vom NADPH ist es bekannt, daß es den Wasserstoff für die Reduktion von oxidiertem Glutathion liefert.

2. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob der Redoxzustand des GSH-GSSG-Systems ebenso wie dies bereits für das NADPH-NADP-System nachgewiesen wurde, von der Glucosekonzentration abhängig ist und ob eine Verschiebung des Redoxzustandes des GSH-GSSG-Systems auf die oxidierte Seite mit einer Hemmung der durch Glucose induzierbaren Insulinsekretion einhergeht.

3. Bisher sind keine Methoden beschrieben worden, die empfindlich genug sind, um GSH und GSSG in Gewebemengen von ca. 10 ug zu bestimmen.

4. Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit bestand daher darin, bekannte Methoden, die zur Bestimmung von GSH und GSSG an größeren Gewebemengen angewandt werden, so zu modifizieren, daß sie auch zur Bestimmung von GSH und GSSG in Gewebemengen von einigen ug anwendbar sind.

5. Die Methode von Tietze sowie Owens und Belcher, die darauf beruht, unter Verwendung von oxidiertem oder reduziertem Glutathion als Katalysator mit Hilfe eines enzymatischen Cycling Ellmans Reagenz von der dimeren Form in die monomere Form, welche dann spektralfotometrisch messbar ist, zu überführen, wobei die Konzentration an monomerem direkt proportional der als Katalysator vorliegenden Konzentration an GSH bzw. GSSG ist, wurde modifiziert.

6. Durch a) Verringerung der Enzymkonzentration
   b) Verringerung der Konzentration an Ellmans Reagenz
   c) Verlängerung der Cycling-Zeit
   d) Erhöhung der Reaktionstemperatur

   konnte erreicht werden, daß Gesamtglutathion und (unter Verwendung von NEM) auch GSH mit ausreichender Genauigkeit in Pankreasinseln zu bestimmen war.

7. Bei der fluorimetrischen Methode nach Hissin reagiert Orthophdialdehyd mit GSH bzw. GSSG zu fluoreszierenden Verbindungen, die bei verschiedenen pH-Werten quantitativ bei der Wellenlän von 420 nm nach Anregung bei 350 nm bestimmt werden können.

8. Durch die Verringerung der entsprechenden Volumina des Ansatzes konnte die Empfindlichkeit der Methode soweit gesteigert werden, daß die Bestimmung von GSH und GSSG in Inseln möglich wurde.

9. Die Bestimmung von GSH und GSSG mit den beiden modifizierten Methoden brachte übereinstimmende Ergebnisse und zwar sowohl bei Leber- als auch bei Inselgeweben. Sie sind daher beide im Prinzip für die Bestimmung von GSH und GSSG in Pankreasinseln geeignet.

10. Da die fluorimetrische Methode jedoch
    1.) empfindlicher
    2.) durch die verwendeten SH-Reagenzien nicht beeinflußt wird
    3.) wesentlich weniger aufwendig und
    4.) auch billiger ist

    wurden praktisch alle Untersuchungen in dieser Arbeit mit dieser Methode durchgeführt.

11. Dabei zeigte sich, daß der GSH-GSSG-Quotient Langerhansscher Inseln von der Glucosekonzentration abhängig ist.

12. Zusatz von Methylenblau führte dosisabhängig zu einer Abnahme des $\frac{GSH}{GSSG}$ Quotienten.

13. Zusatz von Diamid führte dosisabhängig zu einer Abnahme des $\frac{GSH}{GSSG}$ Quotienten.

14. Zusatz von t-BHP führte ebenfalls dosisabhängig zu einer Abnahme des $\frac{GSH}{GSSG}$ Quotienten.

15. Mit denselben Konzentrationen an Methylenblau, Diamid und t-BHP wurde von anderen unter ähnlichen Bedingungen eine Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion beobachtet.

16. Die Tatsache, daß einerseits der GSH-GSSG-Quotient mit der Glucosekonzentration zunimmt und daß damit eine Steigerung der Insulinsekretion verbunden ist, andererseits eine Senkung dieses Quotienten durch Methylenblau, Diamid und t-Butylhydroperoxid mit einer Hemmung der glucoseinduzierten Insulinsekretion einhergeht, spricht für eine Rolle des GSH-GSSG-Redoxzustandes im Mechanismus der glucoseinduzierten Insulinsekretion.

17. Die Rolle, die das GSH-GSSG-System in Zusammenhang mit andere Thiolverbindungen dabei übernehmen könnte, wird diskutiert.

Literatur

1. Anderson, E. and Long, J.A.:
The hormonal influences on the secretion of insulin.
Recent Progr. Hormone Res. 2, 209 (1948)

2. Matschinsky, F.M., Ellerman, J.:
Dissociation of the insulin releasing and the metabolic functions of hexoses in islets of Langerhans.
B.B. Res. Comm. 50, 193-198 (1973)

3. Randle, P.J., Hales, C.N.:
Insulin release mechanisms.
in: Steiner, O.F., Freinkel, N. (eds.), Endocrine Pancreas. Handbook of Physiology, Section 7, Vol. 1, 219-235 (1972)

4. Cooperstein, S.J., Lazarow, A.:
Uptake of glucose by islets of Langerhans.
Am. J. Physiol. 217, 1784 (1969)

5. Hellman, B., Sehlin, J., Taljedahl, I.-B.:
Evidence for mediated transport of glucose in mammalian pancreatic β-cells.
BBA, 241, 147 (1971)

6. Grodsky, G.M., Batts, A.A.:
Effects of Carbohydrates on secretion of insulin from isolated rat pancreas.
Am. J. Physiol. 205, 638 (1963)

7. Coore, H.G. and Randle, P.J.:
Regulation of insulin secretion studies with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro.
Biochem. J. 93, 1264 (1964)

8. Ashcroft, S.J., Bassett, J.M., Randle, P.J.:
Insulin secretion mechanisms and glucose metabolism in isolated islets.
Diabetes 21, Suppl. 2, 538 (1972)

9. Matschinsky, F.M., Landgraf, R.:
Glucoreceptor mechanisms in islets of Langerhans.
Diabetes 21, Suppl. 2, 255 (1972)

10. Pagliara, A.S., Hover, B.A., Ellerman, J. and Matschinsky, F.M.:
Iodoacetate and Jodoacetamide - induced alterations of pancreatic- and β-cell responses.
Endocrinology 97, 698-708 (1975)

11. Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B.:
Effects of phlorhizin on metabolism and function of pancreatic β-cell.
Metab. Clin. Exp. 21, 60-66 (1972)

12. Orci, L., Gabbay, K.H., Malaisse, W.J.:
Pancreatic β-cell web. It's possible role in insulin secretion.
Science 175, 1128 (1972)

13. Kleitzen, R.F., Perdue, J.F., Springer, A.:
Inhibition of sugar uptake in cultured cells.
J. Biol. Chem. 247, 2964 (1972)

14. Mizel, S.B., Wilson L.:
Inhibition of the transport of several hexoses in mammalian cells by cytochalasin B.
J. Biol. Chem. 247, 4102 (1972)

15. Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C. and Randle, P.J.:
Interrelationship of islet metabolism, adenosine triphosphate content and insulin release.
Biochem. J. 132, 223-231 (1973)

16. Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedal I.-B.:
The pancreatic β-cell recognition of insulin secretagogues effects of calcium and sodium on glucose metabolism and insulin release.
Biochem. J. 138, 33-45 (1974)

17. Ashcroft, S.J.H., Weerasinghe, L.C.C., Bassett, J.M. and Randle, P.J.:
The pentose phosphate cycle and insulin release in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 126, 525-532 (1972)

18. Hellerstrom, C.A.:
Oxygen consumption of the β-cells in relation to insulin release.
in: Structure and Metabolism of the Pancreatic Islets, edited by S. Falkmer, S. 315 (1970)

19. Keen, H., Sells, R., Jarrett, R.J.:
A method for the study of the metabolism of isolated mammalian islets of Langerhans and some preliminary results.
Diabetologia 1, 28-32 (1965)

20. Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedal, I.-B.:
The pancreatic β-cell recognition of insulin secretagogues. VIII. Comparisons of glucose with glyceraldehyde isomers and dihydroxyacetone.
Arch. Biochem. Biophys. 162, 448-457 (1974)

21. Pigman, W.:
The carbohydrates, Bd. I u. II
Academic Press, New York (1970/71)

22. Krass, M.E. and Labella, F.S.:
Hexosemonophosphate shunt in endocrine tissues.
Biochim. Biophys. Acta 148, 384 (1967)

23. Field, J.H. and Lazarow, A.:
Comparison of the oxidation of C-1 and C-6 labelled glucose by islet tissue.
Biol. Bull. 119, 313 (1960)

24. Field, J.B., Johnson, P., Herring, B. and Weinberg, A.N.:
Evidence for hexose-monophosphate pathway for glucose metabolism in human pancreatic β-cells.
Nature (Lond.) 185, 468-469 (1960)

25. Kuzuya, T., Kanazawa, Y., Kosaka, K.:
Stimulation of insulin secretion by xylitol in dogs.
Endocrinology 84, 200 (1969)

26. Matschinsky, F.M., Kauffman, F.C. and Ellerman, J.E.:
Effects of hyperglycaemica on the hexose monophosphate shunt in islets of Langerhans.
Diabetes 17, 475-480 (1968)

27. Montague, W. and Taylor, K.W.:
The role of the pentose phosphate pathway in insulin secretion in:The structure and metabolism of pancreatic islets (Falkmer, S., Hellman, B. and Täljedal, L.B. eds.)
Pergamon Press, Oxford, pp 263-274 (1970)

28. Hirata, Y., Fujisawa, M., Sato, H., Asano, T. and Katsuki, S.:
Blood glucose and plasma insulin responses to xylitol administered intravenously in dogs.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24, 471 (1966)

29. Kuzuya, T., Kanazawa, Y. and Kosaka, K.:
Plasma insulin response to intravenous administered xylitol in dogs.
Metabolism 15, 1149 (1966)

30. Heinze, E. and Steinke, J.:
Glucose metabolism of isolated pancreatic islets: Difference between fetal newborn and adult rats.
Endocrinology 88, 1259-1263 (1971)

31. Herken, H.:
Biosynthesis and action of dinucleotides containing 6-aminonicotinamide on membrane transport processes.
Arzneimittel-Forschung 18, 1235-1245 (1968)

32. Ammon, H.P.T. and Steinke, J.:
Effect of 6-Aminonicotinamide on insulin release and C-14 glucose oxidation by isolated pancreatic rat islets: Difference between glucose, tolbutamide and aminophylline.
Endocrinology 91, 33-38 (1972)

33. Ammon, H.P.T. and Steinke, J.:
6-Aminonicotinamide (6-AN) as a diabetogenic agent. In vitro and in vivo studies in rats.
Diabetes 21, 143-148 (1972)

34. Ammon, H.P.T., Verspohl, E., Wagner-Teschner, D.:
Effect of methylene-blue and glucose on $\frac{NADPH}{NADP}$ - ratio in the rat pancreatic islet.
BBA (im Druck)

35. Ammon, H.P.T., Verspohl, E., Händel, M.:
Pentosephosphate shunt-activity depends on glucose concentration.
Diabetologia 13, Abstract 1977, 377

36. Ammon, H.P.T., Patel, T.N. and Steinke, J.:
The role of the pentose phosphate shunt in glucose induced insulin release: in vitro studies with 6-aminonicotinamide, methylene-blue NAD, NADH, NADP, NADPH and nicotinamide in isolated pancreatic rat islets.
Biochem. Biophys. Acta 297, 352 (1973)

37. Ammon, H.P.T., Akhtar, M.S., Niklas, H. and Hegner, D.:
Inhibition of p-Chloromercuribenzoate- and Glucose-Induced Insulin Release in Vitro by Methylene Blue, Diamide, and tert-Butyl Hydroperoxide
Molec. Pharmacology 13, 598-605 (1977)

38. Ammon, H.P.T. and Verspohl, E.:
Pyridine Nucleotides in Pancreatic Islets During Inhibition of Insulin Release by Exogenous Insulin.
Endocrinology, Vol. 99, No. 6 (1976)

39. Akhtar, M.S., Verspohl, E., Hegner, D. and Ammon, H.P.T.:
6-Phosphogluconate/Glucose-6-Phosphate Ratio in Rat Pancreatic Islets During Inhibition of Insulin Release by Exogenous Insulin.
Diabetes, Vol. 26, No. 9, 857-863 (1977)

40. Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B. and Correa, W.S.:
Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 593-596 (1969)

41. Srivastava, S.K., Awasthi, Y.C. and Beutler, E.:
Useful agents for the study of glutathione metabolism in erythrocytes - Organic hydro-Peroxides.
Biochem. J. 139, 289-295 (1974)

42. Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedal, I.B.:
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic ß-cells. Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem. J. 129, 241-254 (1972)

43. Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedal, I.B.:
Membrane Sulphydryl Groups and the pancreatic β-cell recognition of insulin secretagogues.
in: Diabetes (Malaisse, W.J. and Priart, J. eds.), pp 65-78,Excerpta Medica, Foundation, Amsterdam (1974)

44. Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Täljedal, I.B.:
The pancreatic β-cell Recognition of insulin secretagogues XIII. Effects of sulfhydryl reagents on cyclic AMP.
BBA 372, 127-134 (1974)

45. Hellman, B., Sehlin, J., Söderborg, M., Täljedal, I.B.:
The mechanisms of action of chloromercuribenzene-p-sulphonic acid as insulin secretagogue: fluxes of Calcium, Sodium and Rubidium in islets exposed to mercurial and a membrane-active antagonist.
J. Physiol. 252, 701-712 (1975)

46. Watkins, D.T., Moore, M.:
Effect of sulfhydryl-binding reagents on Insulin release from isolated secretion granules.
Endocrinology 95, 485 (1974)

47. Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Söderberg, M. and Täljedal, I.B.:
On the possible role of thiol groups in the insulin-releasing action of mercurials, organic disulfides, alkylating agents, and sulfonylureas.
Endocrinology 99, 1398-1406 (1976)

48. Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, J. and Täljedal, I.B.:
Role of thiol groups in insulin release: Studies with poorly permeating disulphides.
Mol. Pharmacol. 9, 792-801 (1973)

49. Rink, H.:
Thiol compounds in radiation biology. In Glutathione Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. (Flohé, L., Benöhr, R.Ch., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A. eds). Georg Thieme Publishers, Stuttgart p 206-216 (1974)

50. Hanks, J.H., Wallace, E.R.:
Relation of Oxygen and Temperature in the Preservation of Tissues by Refrigeration.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200 (1949)

51. Umbreit, W.W., Burris, R.H. and Stauffer, J.P.:
Manometric and biochemical techniques.
5th Edition, Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minnesota, U.S.A., p 146 (1972)

52. Günterberg, H., Rost, J.:
The True oxidized Glutathione Content of Red Blood Cells Obtained by New Enzymic and Paper Chromatographic Methods.
Anal. Bioch. 15, 205-210 (1966)

53. Mee, J.M.L.:
Gas-liquid chromatographic analysis of glutathione.
J. of Chromatography 87, 258-262 (1973)

54. Hadley, W.M., Bousquet, W.F. and Miya, T.S.:
Modified Fluorescence Assay for Oxidized and Reduced Glutathione in Tissue.
J. of Pharmaceutical Sciences 63, 57-59 (1974)

55. Owens, C.W.J., Belcher, R.V.:
A Colorimetric Micro-Method for the Determination of Glutathione.
Biochem. J. 94, 705-711 (1965)

56. Tietze, F.:
Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione.
Anal. Bioch. 27, 502-522 (1969)

57. Crowley, C., Gillham, B. and Thorn, M.B.:
A Direct Enzymic Method for the Determination of Reduced Glutathione in Blood and other Tissues.
Biochem. Medicine 13, 287-292 (1975)

58. Brehe, J.E. and Burch, H.B.:
Enzymatic Assay for Glutathione.
Anal. Biochem. 74, 189-197 (1976)

59. Cohn, V.H. and Lyle, J.:
A Fluorometric Assay for Glutathione.
Anal. Biochem. 14, 434-440 (1966)

60. Hissin, P.J. and Hilf, R.:
A Fluorimetric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues.
Anal. Biochem. 74, 214-226 (1976)

61. Hartter, P., Weber, U.:
The thiol-disulfide Exchange reactions of Asymmetric Disulfides of cysteine and cyclic cystine peptides with GSH.
in: Glutathione:Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. (Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A. eds). Georg Thieme Publishers, Stuttgart, p. 29-33 (1974)

62. Mannervik, B., Eriksson, S.A.:
Enzymatic reduction of mixed disulfides and Thiosulfate Esters.
in: Glutathione:Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. (Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A. eds). Georg Thieme Publishers, Stuttgart p 120-131 (1974)

63. Mize, C.E., Langdon, R.G.:
Hepatic Glutathione reductase: I. Purification and General Kinetic properties.
J. of Biol. Chem. 237, 1589-1595

64. Massey, V. and Williams, C.H.:
On the Reaction Mechanism of Yeast Glutathione Reductase.
J. of Biol. Chem. 240, 4470-4480 (1965)

65. Jocelyn, P.C.:
Biochemistry of the SH-Group.
Academic Press, London, New York (1972)

66. Gregory, J.D.:
The stability of N-Ethylmaleimide and its Reaction with Sulfhydryl Groups.
J. Am. Chem. Soc. 77, 3922-3931 (1955)

67. Leslie, J., Williams, D.L., Gorin, G.:
Determination of Mercapto Groups in Proteins with N-Ethylmaleimide.
Anal. Biochem. 3, 257-263 (1962)

68. Gorin, G., Martic, P.A., Doughty, G.:
Kinetics of the Reaction of N-Ethylmaleimide with Cysteine and some Congeners.
Arch. of Biochem. and Biophys. 115, 593-597 (1966)

69. Roberts, E., Rouser, G.:
Spectrophotometric Assay for Reaction of N-Ethyl-maleimide with Sulfhydryl Groups.
Analytical Chemistry 30, 1291-1294 (1958)

70. Lee, C.C., Samuels, E.R.:
The Kinetics of Reaction between L-Cysteine Hydrochloride and some Maleimides.
Canadian J. of Chemistry 42, 168-170 (1964)

71. Bergmeyer, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie Weinheim/Bergstr. (1974)

72. Udenfriend, S.:
Fluorescense Assay in Biology and Medicine.
New York, London (1962)

73. Lacy, P.E. and Kostianovsky, M.:
Method for isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas.
Diabetes 16, 35-39 (1967)

74. Winne, D.:
Zur Auswertung von Versuchsergebnissen.
Arzneimittel-Forschung 17, 93-97 (1967)

75. Günzler, W.A., Vergin, H., Müller, J., Flohé, L.:
Glutathion -Peroxidase VI: Die Reaktion der POD mit verschiedenen Hydroperoxiden.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 353, 1001-1004 (1972)

76. Hopkins, F.G.:
Glutathione: A reinvestigation.
J. Biol. Chem. 84, 296-320 (1929)

77. Wendel, A.:
Biosynthesis of Glutathione in red blood cells.
in: Glutathione-Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. (Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A. eds). Georg Thieme Publishers, Stuttgart, p. 69-78 (1973)

78. Rall, I.W. and Lehninger, A.L.:
Glutathione reductase of animal tissues.
J. Biol. Chem. 194, 119-130 (1952)

79. Lumper, L., Zahn, H.:
Adv. Enzymology 27, 199 (1965)
zitiert bei Jocelyn (65)

80. Kosower, N.S., Kosower, E.M.:
Functional Aspects of Glutathione Disulfide and Hidden Forms of Glutathione.
in: Glutathione: Metabolism and Function (Arias, J.M., Jakoby, W.B. eds). Raven Press New York p 159-174 (1976)

81. Isaacs, J., Binkley, F.:
Glutathione dependent Control of protein disulfide - sulfhydryl content by subcellular fractions of hepatic tissue.
BBA 497, 192-204 (1977)

82. Czech, M.P., Lawrence, J.C., Lynn, W.S.:
Evidence for the involvement of sulfhydryl oxidation in the regulation of fat cell hexose transport by insulin.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4173-4177 (1974)

83. Epstein, D.L.:
Introduction to discussion of lens and red cell membrane sulfhydryl groups.
Exp. Eye Res. 11, 351-355 (1971)

84. Malbica, J.O.:
The effect of N,N,N',N'-tetramethylazoformamid (TMAF) on lysosomal stability in the presence and absence of anti-inflammatory agents.
B.B.R.C. 44, 1457-1463 (1971)

85. Siliprandi, D., Soutari, G., Zoccarato, F., Siliprandi, N.:
Action of "Diamide" on some energy linked processes of rat liver mitochondria.
FEBS Lett. 42, 197-199 (1974)

86. Van Horn, D.L., Edelhauser, H.F., Pederson, H.J., Miller, P.M.:
Thiol oxidation of cellular glutathione; effect on corneal endothelium.
J. Cell Biol. (in press), zitiert bei Kosower (80)

87. Günzler, W.A.:
Glutathionperoxidase, Kristallisation, Selengehalt, Aminosäurezusammensetzung und Modellvorstellungen zum Reaktionsmechanismus.
Dissertation, Tübingen (1974)

88. Flohé, L., Günzler, W.A., Jung, G., Schaich, E., Schneider, F.:
Glutathion-Peroxidase, II. Substratspezifität und Hemmbarkeit durch Substratanaloge.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 352, 159-169 (1971)

89. Little, C., O'Brien, R.J.:
An intracellular GSH-Peroxidase with a lipid Peroxide Substrate
B.B.R.C. 31, 145 (1968)

90. Meister, A.:
Biosynthesis and utilization of glutathione; the γ-glutamyl cycle and its function in amino acid transport.
in: Glutathione: Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. (Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A. eds). Georg Thieme Publishers, Stuttgart p 69-77 (1974)

91. Steiner, D.F., Kemmler, W., Clark, J.L., Oyer, P.E., Rubenstein, A.H.:
The biosynthesis of insulin: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology Vol. 1, pp 175-198.
Endocrine pancreas. Ed. by D.F. Steiner, N. Freinkel, Baltimore: Williams and Wilkins (1972)

92. Zühlke, H., Jahr, H., Kohnert, K.-D., Hahn, H.J., Wilke, B., Schmidt, S.:
Degradation of proinsulin and insulin by enzymes of the islets of Langerhans.
Pept. Proc. Eur. Pept. Symp. 12th 1972 (published 1973) ed. by H. Hansen, p. 398-402

93. Kohnert, K.-D., Jahr, H., Schmidt, S., Hahn, H.J., Zühlke, H.:
Demonstration of Insulin degradation by thiol-protein Disulfide oxidoreductase (Glutathione-insuline Trans-hydrogenase) and proteinases of pancreatic islets.
BBA 422, 254-259 (1976)

94. Barnes, M.M., James, S.P., Wood, P.B.:
The formation of mercapturic acid. 1. Formation of mercapturic acid and the levels of glutathione in tissues.
Biochem. J. 71, 680 (1959)

95. Chasseaud, L.F.:
Conjugation with Glutathione and mercapturic acid excretion.
in: Glutathione: Metabolism and function.
edited by Arias, I.M., Jakoby, W.B. p 77-114 (1976)

96. Kosower, E.M., Kosower, N.S.:
Chemical basis of the perturbation of Glutathione - Glutathione disulfide Status of biological Systems by diazenes.
in: Glutathione: Metabolism and function.
edited by Arias, I.M., Jakoby, W.B. p 139-157 (1976)

97. Ogura, R., Seiji, M.:
J. Biochem. Tokyo 60, 222 (1966), zitiert bei Jocelyn (65

98. Bhattacharya, S.K., Robson, J.S., Steward, C.P.:
Biochem. J. 60, 696 (1955), zitiert bei Hissin (60)

99. Dohan, J.S., Woodward, G.B.:
J. Biol. Chem. 129, 393 (1939), zitiert bei Hissin (60)

100. Güntherberg, H., Rapoport, S.:
Acta biol. Med. Germ. 20, 559 (1968)
zitiert bei Hissin (60)

101. Falkmer, S., Havu, N., Boquist, L.:
Role of sulfhydryl compounds and heavy metals in the synthesis and storage of insulin.
in: The structure and metabolism of the pancreatic islets, ed. by Falkmer, S., Hellman, B., Täljedal, I.B., Pergamon Press (1970)

102. Ashcroft, S.J.H., Hedeskov, C.H., Randle, P.J.:
Glucose metabolism in mouse pancreatic islets.
Biochem. J. 118, 141-154 (1970)

103. Heinle, H., Sawatzki, G., Wendel, A.:
Glutathion-Biosynthese VII: Die Biosynthese von GSH in Humanerythrocyten.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 357, 1451-1488 (1976)

104. Ammon, H.P.T.:
Effect of glucose and methylene blue (MB) on NADP, NADPH and insulin secretion of isolated pancreatic rat islets.
Arch. Pharmacol. 277 Suppl. R 1 (Abstract) (1973)

105. Niklas, H.:
Einfluß von Methylenblau, Diamid, t-Butylhydroperoxid auf die Sekretion von Insulin aus isolierten Langerhansschen Inseln des Rattenpankreas - Bedeutung von NADPH und reduziertem Glutathion.
Dissertation Tübingen (1978)

106. Scott, E.M., Duncan, I.W., Ekstrand, V.:
Purification and properties of glutathione reductase of human erythrocytes.
J. Biol. Chem. 238 3928 (1963)

107. Hoppe, E.:
Einfluß von Leucin und Arginin auf die Sekretion von Insulin sowie den $\frac{NADPH}{NADP}$ - Quotienten und den $\frac{NADH}{NAD}$ - Quotienten Langerhansscher Inseln.
Dissertation Tübingen (1978)

108. Beutler, E., Yeh, M.K.Y.:
Erythrocyte glutathione reductase.
Blood 21, 573 (1963)

109. Beutler, E.:
Glutathione reductase
in: Glutathione: Proceedings of the 16th Conference of the German Society of Biological Chemistry. (Flohé, L., Benöhr, H.Ch., Sies, H., Waller, H.D. and Wendel, A. eds). Georg Thieme Publishers, Stuttgart p 109-114 (1974)

Lebenslauf

Am 21. April 1949 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Otto Grimm und seiner Ehefrau Marie-Luise , geborene Wehner, in Baden-Baden geboren. Als ich sechs Jahre alt war, zogen wir nach Leonberg.

Nach dem Besuch der dortigen Grundschule von 1956-1960 wechselte ich in das Albert-Schweitzer-Gymnasium Leonberg, wo ich 1968 das Abitur ablegte.

Von September 1968 bis September 1970 leistete ich mein pharmazeutischen Praktikum in einer Stuttgarter Apotheke ab. Nach bestandenem Vorexamen begann ich im Wintersemester 1970/71 mit dem Chemie-Studium an der Universität Stuttgart und im Sommersemester 1971 mit dem Pharmazie-Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, das ich am 18. April 1974 mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit Oktober 1974 bin ich mit der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. H.P.T. Ammon am Lehrstuhl Pharmakologie des Pharmazeutischen Instituts der Eberhard-Karls-Universität Tübingen beschäftigt und auch seit dieser Zeit als wissenschaftliche Hilfskraft tätig.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren H. Auterhoff, E. Graf, K.-A. Kovar, F. Moll, E. Reinhard (Pharmazie); R.E. Bader (Bakteriologie und Hygiene); E. Müller, W. Rüdorff (Chemie); H. Krüger (Physik); M. Siess (Pharmakologie); H. Machleidt (Biochemie).